

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR
TESIS DOCTORAL

**Funciones de los Receptores de Estrógenos en las neuronas primarias:
interacción con otras vías intracelulares e implicación en la morfología
neuronal**

Olga Varea Abbad

Madrid 2009



Departamento de Biología Molecular
Universidad Autónoma de Madrid

Madrid, 24 de Julio de 2009

Dr. Francisco Wandosell Jurado como Científico del Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” y miembro del Departamento de Biología Molecular de la Universidad Autónoma de Madrid

INFORMA

Que la presente tesis doctoral titulada **“Funciones de los Receptores de Estrógenos en neuronas primarias: interacción con otras vías intracelulares e implicación en morfología neuronal”** “ha sido realizada bajo mi dirección por *Dña Olga Varea Abbad*. Considero que el trabajo reviste las características de originalidad y calidad científica requeridas para ser defendido como Tesis Doctoral para optar al Grado de Doctor.

El director de la tesis.

Dr. Francisco Wandosell Jurado

Memoria de Investigación presentada por
Olga Varea Abbad
Para optar al grado de
Doctor en Ciencias
por la Universidad Autónoma de Madrid

Trabajo dirigido por el
Dr. Francisco Wandosell Jurado
Profesor de Investigación del CSIC
Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”

A mi madre

A mi padre

A mi hermana

AGRADECIMIENTOS

Después de todo este tiempo ha llegado el momento de agradecer a todo el mundo que he tenido cerca durante estos años su apoyo que es algo realmente inolvidable para mí.

En primer lugar, quiero agradecer a Paco la gran oportunidad que me dio al trabajar en su laboratorio. Siempre transmitiendo entusiasmo por lo desconocido y esfuerzo para descifrar cada pequeño detalle. Me gustaría recalcar, no sólo mi agradecimiento como director de esta tesis a todas sus enseñanzas y su espíritu de trabajo, sino también en otros aspectos tan importantes como su apoyo, paciencia, comprensión y fuerza que hacen de él ser una gran persona...muchas gracias.

También me gustaría dar las gracias en especial a Luis Miguel García-Segura por toda la ayuda prestada durante la realización de este trabajo.

Gracias a Antonio Nieto por acogerme durante un tiempo largo en su laboratorio y junto con Carlos ser una ayuda constante de gran valor. Muchas gracias por estar siempre disponibles para cualquier cosa que sugiera.

Me gustaría también agradecer a Juanjo sus ideas y tantas conversaciones, que junto con Javier, Filip, Maite, Inés, y Mar se han podido resolver las dudas que han ido surgiendo a lo largo de este tiempo.

No sé qué hubiera sido todo este tiempo sin mis compañeros del laboratorio y de otros laboratorios cercanos. Es inestimable, e innumerable, vuestra ayuda dentro y fuera del laboratorio pero quería plasmar en unas frases una pequeña parte de mis sentimientos.

Gracias a Diana por toda tu ayuda y cariño desde el primer día que llegué al laboratorio y hasta hoy, a Ana F por tanto compartido en tantos “campos” durante este tiempo, a Mónica, Héctor, Diana y Ana por los momentos musicales que tantos buenos momentos nos han dado aunque fuera escuchando freejazz, a Ricardo, Vega, Nuria, Irene, Lara R., Lara O, y a los que llegan Marta, Maribel y Jonay por compartir el día a día todo este tiempo, los últimos coletazos del trabajo, cenas y salidas que espero que se retomen pronto.

Gracias por supuesto, también al antiguo 470, punto de inicio de este proyecto, por el tiempo que estuvimos juntos antes de la mudanza a Chus, a Anita, a Maite, a Inma, a Gloria y a los que salieron ya a Alfredo, a Isma, a Marta, a Erika porque allí hemos compartido muchos buenos momentos.

También en los laboratorios vecinos he encontrado muchas sonrisas, gracias a Yuri por cruzar tantas veces conmigo el campo a través y por tantas cosas más, Juan Carlos, Dani, Toñi y Sara, a Jon, a Elisa por toda la energía que transmiten y las excursiones al monte, siempre con ganas de organizar otra.

Hemos compartido muchas cosas en las comidas y fuera de ellas, Alberto, Thorsten, Paloma, Alicia, Nuria, Marta, Elenita, Elena G, Elena T, Almudena, Zahady, Patricia, Miguel y Raquel porque sin ese pequeño respiro las cosas se hubieran visto de otra manera. Hay tantas

conversaciones de comidas que tendrían que haber sido grabadas...Muchas gracias a Laura por escucharme siempre con tanto empeño y sin cenar.

Fuera del laboratorio han soportado tantas cosas tanto tiempo otro grupo de gente importantísima en mi vida. Quedar con vosotros ha supuesto siempre aire fresco para mí, os debo muchísimo.

Muchas gracias a Ana, a Pedro, a Denis, a Aida, Ana W, a Pili, a Loreto, amigos desde que llegamos a una nueva ciudad con grandes ilusiones. No tengo palabras porque realmente habéis sido mi familia y suponéis tanto...

A Estela, por escucharme siempre y hacerme sentir que volvía a casa (qué suerte es tenerte cerca) y a Sheila porque desde antes de que habláramos ya éramos inseparables y aprendimos juntas el significado de la palabra amistad.

También a Montse, Ángela y Carolina por esos viajes de los que siempre quedan fotos, a Jorge, por los relojes que no marcan las horas juntos.

Muchas gracias a Andrés por su cariño, pinacoteca y magnanimidad....

...y gracias Enrique, por hacerme salir de Ucrania y llenar tanto cada día con tus interesantes proyectos que apoyo firmemente y por transmitirme infinidad de cosas más.

Por último, a las tres personas más importantes en mi vida, mi familia.

Muchas gracias a mi padre, a mi madre (siempre te tengo presente en todo porque me has enseñado muchísimo) y a mi hermana, los tres pilares fundamentales que con su apoyo constante y todo su cariño me han animado siempre a conseguir cada cosa que me propusiera. Además de “La familia 8”, famosa novela, me hubiera gustado hablar también de las aves divagantes en Sudáfrica que seguiré observando siempre pero creo que es mejor que mi hermana me haga reír como ella sabe para poder continuar y daros infinitas gracias a los tres por soportar todos mis malos momentos y alegraros de las cosas buenas conmigo.

Mil gracias a todos por todo lo que no he podido nombrar y por todo lo que nos queda por hacer juntos porque así se consigue una amplia sonrisa.

SUMMARY

SUMMARY.

The estrogen receptors are implicated in many cellular functions in different cell types. Particularly, in neurons they participate in signalling pathways implicating survival, cytoskeleton rearrangement or synaptic transmission. Two classical isoforms, ER α and ER β as well as other variants, has been described with differences in their implication in cellular signalling. Several studies have determined that local synthesis of estradiol takes place in the CNS in both neurons and glia in different regions as cortex and hippocampus among other locations. Our recent data indicated that ER activates a PI3K/Akt pathway in neurons similar to other growth factors. In this thesis work we describe the capacity of estradiol to activate Akt by increasing its phosphorylation status at two regulatory residues. Subsequently, it takes place the phosphorylation of GSK3 and the activation of mTORC1 pathway in primary neurons in an ER α /ER β -dependent manner. The inactivation of GSK3 by Akt leads to its inhibition, resulting in the accumulation of one of its targets, β -catenin. This work analyzes the time course of β -catenin stabilization in response to estradiol in cortical primary neurons. It reaches a maximum at 60 min of estradiol addition in correlation with the peak of GSK3 inhibition. A consequence of the increase of β -catenin is the activation of gene transcription through TCFs/DNA complex obtaining a gene profile expression not totally coincident with the initiated by Wnt canonical pathway. This mechanism of estradiol-initiated gene transcription that depends on the formation of a β -catenin/TCF/DNA complex represents a novel mode of action of estradiol in neurons.

The expression of estrogen receptors takes place early in the embryo and is maintained during adulthood. The neuronal development process is potentiated by the presence of estrogen, in this work we have defined a role both ER α and ER β in neurite elongation. Blokade of estrogen receptor signalling, either by ER β depletion or through the use of an ER antagonist at the early stages of neuron differentiation reduces neurite extension. However, the blocking effect of ER antagonist does not impede the formation of a maturation axonal compartment, the axon initial segment. Taking the Akt activity modulation by estradiol we focused on several PI3K/Akt targets in order to reverse the reduced-morphology obtained by non-functional ERs. We finally obtained a correct axonal elongation even in the presence of ER antagonist by two different mechanisms: RhoK inhibition and Rheb active protein expression in hippocampal neurons.

ÍNDICE

ÍNDICE.

Apartado	página
<i>Índice</i>	1
<i>Abreviaturas</i>	5
<i>Introducción</i>	11
1-Mecanismos moleculares que controlan el desarrollo neuronal	13
1.1. Neuritogénesis-Polarización Neuronal-Sistemas modelo.....	13
1.2. Mecanismos que regulan la neuritogénesis y la polaridad neuronal.....	15
1.3. Vía de activación de PI3K, papel en desarrollo neuronal. Dianas de Akt y otras rutas.....	16
2-Estrógenos	27
2.1. Ruta de síntesis y metabolismo de estradiol.....	27
2.2. Antagonistas estrogénicos.....	29
3-Función de los estrógenos en cerebro	30
3.1.Efecto de los estrógenos en el desarrollo neuronal.....	30
3.2. Efecto de los estrógenos en neuronas maduras: excitabilidad de la membrana.....	30
3.3. Papel de los estrógenos en funciones cognitivas.....	31
3.4. Neuroprotección.....	32
4-Receptores de estrógenos	33
4.1. ER α y ER β	33
4.2. Receptor GPR-30.....	37
4.3. Expresión de los receptores de estrógenos en cerebro.....	38
4.4. Localización de los receptores de estrógenos.....	38
4.5. Modificaciones post-traduccionales de los receptores de estrógenos.....	40
4.6. Sistemas de estudio para los receptores de estrógenos.....	41
5-Mecanismos de acción de los estrógenos	42
5.1. Señalización a través del receptor GPR-30.....	42
5.2. Acción nuclear o “acción genómica” a través de ER α y ER β	43
5.3. Vías de señalización citoplasmáticas o de “acción rápida” mediante los ERs.....	45
<i>Objetivos</i>	47

<i>Materiales y Métodos</i>	51
<i>Resultados</i>	69
<i>- Expresión, localización e implicación de los receptores de estrógenos en el desarrollo de neuronas en cultivo</i>	71
1. Expresión de los receptores de estrógenos en neuronas primarias de corteza.....	71
2. Localización de los receptores de estrógenos en neuronas de corteza e hipocampo.....	73
3. Análisis de la función de los receptores de estrógenos en el desarrollo neuronal.....	75
<i>- Señalización intracelular mediada por estradiol</i>	85
4. Activación de la vía PI3K-Akt por estradiol.....	85
5. Estradiol promueve la activación de mTORC1.....	86
6. Inhibición de GSK3 por estradiol. Efecto sobre β -catenina.....	88
7. Efecto de estradiol sobre la actividad MAPK.....	113
8. Papel de estradiol sobre PI3K-Akt-GSK3 en desarrollo neuronal.....	114
<i>- Control de las vías de señalización mediadas por estradiol sobre la morfología neuronal</i>	117
8. Efecto de la sobreexpresión de β -catenina en la longitud axonal regulada por estrógenos..	117
9. Análisis de la implicación de la actividad Rheb/mTORC1 en el desarrollo neuronal mediado por ERs.....	119
10. Implicación de la dinámica de actina en el crecimiento de neuritas mediado por ERs.....	124
<i>Discusión</i>	129
<i>Conclusiones</i>	153
<i>Bibliografía</i>	159
<i>Anexos</i>	177

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

A β : *Amyloid β -peptide* / Péptido β Amiloide
APC: *Adenomatous polyposis coli gene product* / Proteína de la poliposis adenomatosa de colon
AP-1: *Activator Protein-1* / Proteína activadora 1
APP: *Amyloid Precursor Protein* / Proteína Precursora de Amiloide
ARN: ácido ribonucleico
ARNi: ARN de interferencia
ATP: *Adenosine triphosphate* / Adenosina trifosfato
 β -cat: β -catenina
 β gal : β -galactosidase / β -galactosidasa
BDNF: Brain-derived-Neurotrophic factor
BSA: *Bovine Serum Albumin* / Seroalbúmina Bovina
C-terminal: Carboxi terminal
CytoD: CytochalasinD/ Citocalasina D
CK-I: *Casein Kinase I* / Caseína Quinasa I
CK-II: *Casein Kinase II* / Caseína Quinasa II
Cx: *Cortex* / Corteza
DAG: diacilglicerol
DBD: DNA-binding domain /dominio de unión a ADN
DIV: *Days in vitro* / Días *in vitro*
DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* / Medio Eagle modificado de Dulbecco
DMSO: *Dimethyl sulfoxide* / Dimetilsulfóxido
DNA: *Deoxyribonucleic Acid* / Ácido Desoxirribonucleico
DPN: 2,3-bis (4-hydroxyphenyl)-propionitrile
DTT: *Dithiothreitol* / Ditiotreitól
Dvl: *Dishevelled*
E/E2: estradiol
EA: Enfermedad de Alzheimer
E-Cadh: epithelial-cadherin
ECL: *Enhanced Chemiluminescent* / Sustrato quimioluminiscente
EDTA: *Ethylenediaminetetracetic acid* / Ácido Etildiaminotetracético
EGTA: *Ethylenglycoltetracetic* / Ácido Etilenglicoltetracético
eIF2B: *eukaryotic initiation factor 2B* / Factor de Iniciación Eucariótico 2B
En2: Engrailed2
ER: Estrogen receptor
ERR: estrogen receptor related/ Receptor relacionado con receptor de estrógenos
ERE: estrogen receptor element/ elemento del receptor de estrógenos
ERK: *Extracellular signal Regulated Kinase* / Quinasa regulada por señal extracelular
FBS: *Foetal Bovine Serum* / Suero Fetal Bovino
FCS: foetal calf serum
FRAT: *Frequently Rearranged in Advanced T cell lymphocytes* / Frecuentemente Reordenado en linfocitos T avanzados
FzzR: *Frizzled Receptor* / Receptor de Frizzled
GAPs: GTPase activating proteins/ proteínas activadoras de GTPasa
GAP-43: *Growth Associated Protein-43* / Proteína Asociada al crecimiento 43
GBP: *GSK-3 Binding Protein* / Proteína de unión a GSK-3
GEFs: guanine nucleotide Exchange factor/ factor intercambiador de nucleótidos de guanina
GFAP: *Glial Fibrillary Protein* / Proteína Glial Fibrilar
GFP: Green fluorescent protein /Proteína verde fluorescente
GluR1: Receptor de AMPA 1
GPR30: G-protein coupled receptor 30/ receptor acoplado a proteínas G 30
GS-1: *Glycogen Synthase I* / Glucógeno Sintasa 1

GSK-3: *Glycogen Synthase Kinase 3* / Glucógeno Sintasa Quinasa 3
GST: *Glutathione-S-Transferases* / Transferasas de Glutathione
GTP: Guanosine-5'-Triphosphate/ Guanosina-5'-Trifosfato
HEPES: *N-(2-hydroxyethyl)-piperazine-N'-(2-ethanesulfonic acid)* / N-(2-hidroxietil)-piperacina-N'-(2-ácido etanolsulfónico)
Hp: *Hippocampus* / Hipocampo
Hsp90/70: *Heat shock protein 90/70* / Proteína de choque térmico 90/70
ICI: ICI 182,780
IC₅₀: *Inhibitory Concentration* / Concentración Inhibitoria
IF: Inmunofluorescencia
IgG: Immunoglobulin /Inmunoglobulina
IHQ: Inmunohistoquímica
IL-8: Interleukin-8/ interleuquina 8
ILK: *Interleukin Linked Kinase* / Quinasa unida a Integrina
Ins: Insulin /Insulina
IP: immunoprecipitation /Inmunoprecipitación
IP₃: *Inositol triphosphate* / Inositol trifosfato
IP₃R: *Inositol triphosphate Receptor* / Receptor de Inositol trifosfato
IRS: *Insulin receptor substrate* / Sustrato del Receptor de Insulina
KA: *Kainic Acid* / Ácido Kainico
kDa: kilo Dalton
kb: kilobases
LBD: ligand binding domain /dominio de union a ligando
LEF: Lymphoid-enhanced factor
LTD: *Long-Term Depression* / Depresión a largo plazo
LTP: *Long-Term Potentiation* / Potenciación a largo plazo
LPA: lysophosphatidic acid /ácido lisofosfatídico
LRP5/6: *Low density Lipoprotein Receptor-related Protein 5/6* / Proteína relacionada con el receptor de lipoproteína de baja densidad 5/6
MAP: *Microtubule Associated Protein* / Proteína Asociada a Microtúbulos
MAPK: *Mitogen Activated Protein Kinase* / Proteína Quinasa Activada por Mitógenos
MEK1: *MAP kinase kinase* / MAP quinasa quinasa
MEM: Modified-Eagle-medium
mGluR1α: *metabotropic Glutamate Receptor* / Receptor metabotrópico de Glutamato
MMPs: matrix metalloprotease/ metaloproteasas de la matriz
mRNA: *Messenger Ribonucleic Acid* / Ácido Ribonucleico mensajero
NB: *Neurobasal Medium* / Medio Neurobasal
N-Cadh: Neural-cadherin
NCAM: *Neural Cell Adhesion Molecule* / Molécula de Adhesión Celular Neuronal
NES: *Nuclear Export Signal* / Señal de Exportación Nuclear
NF-κB: *Nuclear Factor κB* / Factor nuclear κB
NFP: *Axonal Neurofilament Protein* / Proteína de Neurofilamento axonal
NGF: *Nerve Growth Factor* / Factor de Crecimiento Nervioso
NMDA: *N-methyl-D-Aspartate* / N-Metil-D-Aspartato
NLS: *Nuclear Localization Signal* / Señal de Localización Nuclear
NT: neurotrophin/ Neurotrofina
N-terminal / Amino Terminal
P: *Phosphate* / Fosfato
p90 RSK: p90 Ribosomal S6 Kinase / p90 Quinasa Ribosomal S6
PBS: *Phosphate-Buffered Saline* / Solución Salina de Fosfato Tamponada
PCR: *Polymerase Chain Reaction* / Reacción en Cadena de la Polimerasa
PDK: *Phosphoinositide-Dependent Kinase* / Quinasa dependiente de fosfoinosítido
PFA: *Paraformaldehyde* / Paraformaldehído
PI3K: *Phosphoinositide-3-Kinase* / Fosfoinosítido-3-Quinasa
PIP₂: *Phosphatidylinositol bisphosphate* / Fosfatidil Inositol bifosfato

PIP₃: *Phosphatidylinositol trisphosphate* / Fosfatidil Inositol trifosfato
PKA: *Protein Kinase A* / Proteína Quinasa A
PKB: *Protein Kinase B* / Proteína Quinasa B
PKC: *Protein Kinase C* / Proteína Quinasa C
PLC: *Phospholipase C* / Fosfolipasa C
Plg: plasminogen/ plasminógeno
PMSF: *Phenylmethylsulphonyl Fluoride* / Fluoruro de Fenilmetilsulfonato
PPAR γ : Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ
PP1: *Protein Phosphatase 1* / Proteína Fosfatasa 1
PP2A: *Protein Phosphatase 2A* / Proteína Fosfatasa 2^a
PPT: 4,4',4'' - (4-propyl-1H-pyrazole-1,3,5-triyl)trisphenol
PrP^C: *Prion-related Peptide* / Péptido relacionado con el Prión
PrP^{SC}: *Scrapie form of Prion-related Peptide* / Forma *scrapie* del Péptido relacionado con el Prión
PSD: *Postsynaptic Density* / Densidad Postsináptica
PSD95: *Postsynaptic Density-95 Protein* / Proteína de la Densidad Postsináptica 95
Rapa: Rapamycin /Rapamicina
Rheb: Ras-homologue enhanced in brain /Homólogo de Ras enriquecido en cerebro
RhoK: Rho Kinase/ Quinasa de Rho
RNA: *Ribonucleic Acid* / Ácido Ribonucleico
RLU: relative Light units/ unidades de luz relativas
RT-PCR: retrotranscriptase PCR/ PCR retrotranscriptase
SDS: *Sodium Dodecyl Sulphate* / Dodecil Sulfato Sódico
SDS-PAGE: *SDS-Polyacrilamide Gel Electrophoresis* / Gel de Electroforesis de Poliacrilamida con SDS
TCF: *T Cell Factor* / Factor de células T
Tg: transgenic / transgénico
TSC1/2: Tuberous Sclerosis 1/2
TNF- α : *Tumor necrosis factor- α* / Factor de necrosis tumoral α
WB: *Western-Blot*
WT: *wild type*

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN.

1- Mecanismos moleculares que controlan el desarrollo neuronal.

1-1 Neuritogénesis –Polarización Neuronal-Sistemas modelo.

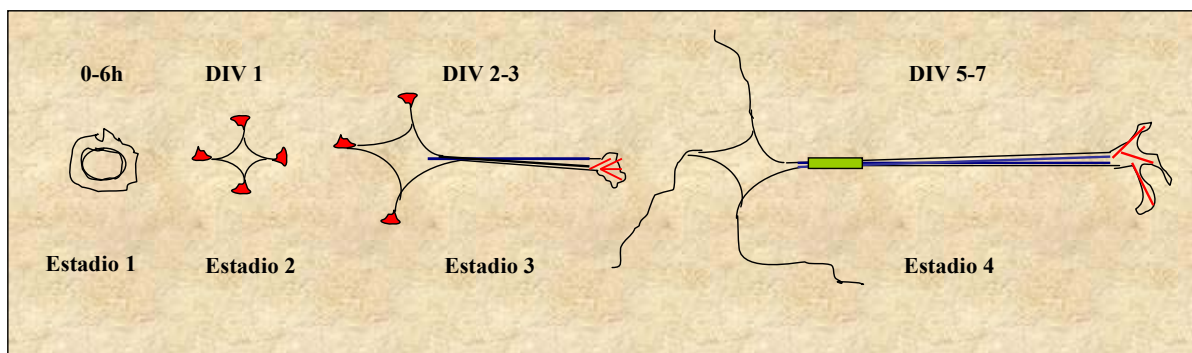
Desarrollo de una estructura compleja polarizada.

El **desarrollo de una neurona** hasta alcanzar su estado maduro es un proceso complejo que supone una remodelación constante de su morfología, desde una situación de neuroblasto post-mitótico comprometido en el linaje neuronal, hasta una variedad final de morfologías neuronales diferentes. Este proceso parece estar basado en la acción de una amplia serie de ligandos y receptores que condicionan, en diferentes regiones del cerebro embrionario, dos respuestas paralelas en los neuroblastos no diferenciados: por un lado, una morfogénesis que sigue un patrón con características análogas de bipolaridad axón-dendrita, y por otra, la señalización específica que consigue dar lugar a una gran variedad de formas finales como son los ejemplos de neuronas granulares de cerebelo (Gao and Hatten 1993; Komuro et al. 2001), y neuronas de corteza (Hatanaka and Murakami 2002; Noctor et al. 2004; Shoukimas and Hinds 1978) o piramidales de hipocampo (Goslin and Banker 1989).

Estos tres tipos neuronales constituyen los modelos más utilizados para el estudio de la polaridad y diferenciación neuronal dado que se pueden cultivar de manera homogénea *in vitro*. Finalmente estos procesos condicionan la funcionalidad de todo el Sistema Nervioso de los mamíferos.

Gracias a dichos estudios se han podido determinar los diferentes estadios de desarrollo por los que pasan las neuronas durante la diferenciación *in vitro* (Craig and Banker 1994; Kaech and Banker 2006). El sistema de cultivo de neuronas disociadas a partir de hipocampo embrionario sigue un proceso de desarrollo similar al que ocurre *in vivo* a partir de los neuroblastos en sus primeras fases y ha sido generalizado como sistema de estudio. Se ha clasificado la transición que sufren las neuronas en cultivo en varios estadios, desde su plaqueo (estadio 1) hasta que desarrollan axones maduros, dendritas, espinas dendríticas y contactos sinápticos funcionales (estadio 5) (Craig and Banker 1994), (Dotti et al. 1988).

Para comprender mejor el proceso de desarrollo, se especifican brevemente a continuación los primeros estadios (**Esquema 1**). En un primer lugar, toda la membrana plasmática de la célula conforma una estructura de lamelipodio rica en actina que rápidamente emite prolongaciones citoplasmáticas en forma de filopodios de forma radial (estadio 1) (Dotti et al. 1988) que posteriormente adquieren un grosor mayor y contenido en componentes del citoesqueleto dando lugar a las extensiones denominados neuritas (estadio 2).



Esquema 1. Etapas de la diferenciación neuronal en cultivo. Se muestran en el esquema los 4 primeros estadios en los que a partir de una neurona post-mitótica simétrica se consigue la polaridad que caracteriza a la neurona madura (Dotti et al. 1988). En la neurona se diferencian dos compartimentos claros: somatodendrítico y axonal, con un subcompartimento diferencial en su región proximal, el segmento inicial del axón (verde). Durante la adquisición de la morfología final, que viene acompañada con su capacidad funcional en un estadio posterior, juegan un papel importante tanto factores extrínsecos (neurotrofinas y otros factores de crecimiento) como intrínsecos, principalmente el citoesqueleto de actina (rojo), y de tubulina, (azul)

Este proceso requiere una alta dinamicidad de las estructuras (fundamentalmente citoesqueleto de actina y tubulina) que constituyen las prolongaciones neuronales y que se encuentran continuamente en avance y retroceso en esta fase. Por un mecanismo todavía desconocido, una de las neuritas comienza una extensión mucho mayor y con mayor velocidad que el resto, ésta determinará el axón (estadio 3).

Existen diversos factores que pueden estar determinando la conversión de una neurita en axón como son la distribución de componentes celulares como la posición del centrosoma (Bradke and Dotti 1999) en la base de una neurita, la acumulación de los orgánulos de manera polarizada o también la disponibilidad de algunas proteínas intracelulares en los primeros momentos del desarrollo de la neurona (Wiggin et al. 2005). El extremo distal de la neurita en crecimiento conforma una estructura denominada “cono de crecimiento” que explora el entorno y se extiende o retrae en función de las señales externas que detecta. Además, el cono de crecimiento de lo que será el futuro axón en neuronas todavía no polarizadas presenta una disminución de la estabilización de actina (Bradke and Dotti 1999). Este hecho permite una mayor protrusión de los microtúbulos en este cono de crecimiento y por tanto una mayor velocidad de elongación con respecto al resto de las neuritas. Parte de esta desestabilización del citoesqueleto de actina tiene lugar por la actividad de proteínas de la familia de las Rho-GTPasas y sus efectores (Kunda et al. 2001) que regulan diferentes aspectos de la morfología neuronal como el crecimiento, retracción, parada y ramificación del cono de crecimiento y las neuritas (Luo 2000).

La neurona queda, a partir del momento de formación del axón, dividida en dos compartimentos de características diferentes: compartimento somatodendrítico y axón. La maduración de la neurona continúa con la especialización de dichos compartimentos, mediante la adquisición de una mayor

complejidad del árbol dendrítico, la expresión de receptores que mediarán la actividad neuronal y el establecimiento de conexiones sinápticas con otras neuronas.

1.2. Mecanismos que regulan la neuritogénesis y la polaridad neuronal.

Durante los últimos 25 años se han descrito y estudiado de manera exhaustiva una serie de ligandos y receptores cuyas acciones determinan la polaridad neuronal. Entre ellos podemos destacar moléculas tales como el IGF1 (factor de crecimiento similar a la insulina de tipo 1) y su receptor IGF1R, las neurotrofinas y sus receptores y el sistema de Wnt y sus receptores. Muchos de estos factores están embebidos en la matriz extracelular y dirigen la navegación axonal tanto favoreciendo la atracción y avance del cono de crecimiento como la retracción por repulsión frente a un estímulo. Los gradientes finales de atracción/repulsión determinarán la dirección de avance final del axón.

Entre los factores implicados en procesos de polaridad y motilidad neuronal se encuentran las neurotrofinas, familia de proteínas incluye el factor de crecimiento nervioso NGF (*Nerve Growth Factor*), el factor neurotrófico derivado del cerebro, BDNF (*Brain-derived-Neurotrophic Factor*) o las neurotrofinas 1, 3 y 4 (NTs) (Gehler et al 2004) (Song and Poo 2001) siendo otro de los factores cruciales el factor IGF-1.

El IGF-1 es sintetizado de forma mayoritaria en el hígado en respuesta a la hormona de crecimiento, pero con un efecto neurotrófico en el SNC ampliamente estudiado (Trejo et al. 2004). Mediante su interacción con su receptor (IGF-R) favorece la diferenciación, la supervivencia (Peruzzi et al. 1999) o la actividad neuronal (Nunez et al. 2003).

La activación de IGF-R y TrkB y otros receptores de neurotrofinas desencadena diversas cascadas de señalización que dan lugar a la activación de PLC, MAPK, PI3K o modulación de proteínas de la familia Rho-GTPasas. Puesto que varios de los factores que potencian la neuritogénesis y la extensión axonal confluyen en la activación de PI3K (*Phospho-inositide-3-kinase*), Erk (*extracellular regulated kinase*) y GTPasas se detalla a continuación los componentes de estas rutas intracelulares.

En esta sección, centraremos nuestra atención a las vías de señalización de PI3K y la señalización de Wnt que han sido objeto de estudio en este trabajo de tesis. Planteamos la vía de activación de PI3K en su papel esencial en la diferenciación neuronal y destacaremos algunas de las dianas de la proteína Akt que hemos analizado en este trabajo como posibles candidatos de la regulación por estrógenos.

1.3. Vía de activación de PI3K y su papel en desarrollo neuronal. Dianas de Akt y otras rutas.

La vía que sigue a la activación del receptor de Insulina/IGF-1 da lugar a la modificación de la actividad de varios componentes esenciales para la formación y elongación del axón. En el esquema 2 vienen representados algunos de los componentes implicados en este proceso.

PI3K.

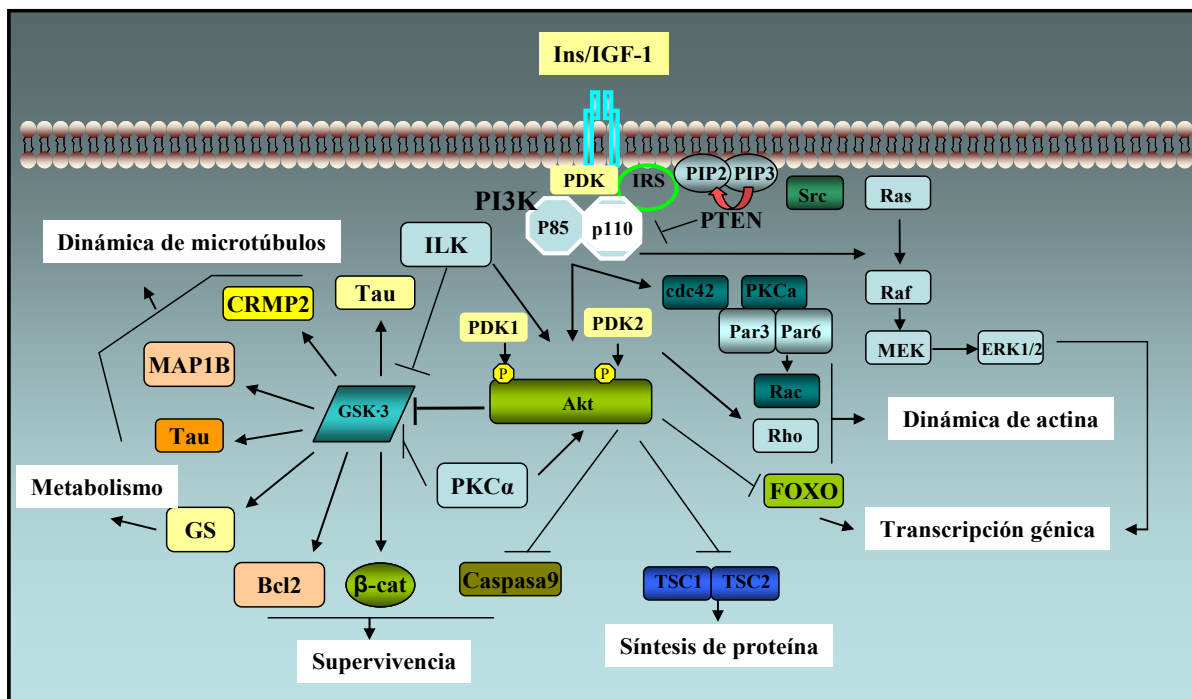
La implicación de la PI3K en la especificación del axón y su crecimiento ha sido ampliamente descrito en numerosos trabajos, en los que mediante la inhibición de la misma con los compuestos LY294002 o Wortmanina se impide la formación del axón (Jiang et al. 2005; Menager et al. 2004; Shi et al. 2003).

La activación de la enzima PI3K depende de la autofosforilación en tirosina del receptor de IGF-1 (IGF-R) con la llegada del ligando (Insulina/IGF-1). También la activación de Ras durante la transducción de la señal juega un papel en la activación de PI3K (Yoshimura et al. 2006). Esta enzima está constituida por dos subunidades: la subunidad catalítica (familia p110) y la subunidad reguladora (familia p85). La sobreexpresión de la subunidad catalítica, p110 α , es suficiente para inducir la aparición de múltiples axones en neuronas de hipocampo. La activación de la enzima PI3K origina un aumento local en los niveles de fosfatidil-inositol-(3,4,5) trifosfato (PIP3) generado a partir de fosfatidil-inositol-4,5 bifosfato (PIP2) presentes en la membrana plasmática. La producción de fosfoinosítidos por PI3K es revertida por la proteína PTEN (*Phosphatase and Tensin homologue*) que posee actividad fosfatasa sobre el fosfoinosítido en posición 3'.

Un indicador claro de la activación local de PI3K en la neurita que se convertirá en el axón es la acumulación de PIP3 en neuronas de hipocampo en estadio 2 (Menager et al. 2004). Además de la acumulación de PIP3 en el axón emergente tiene lugar un aumento del número de estas moléculas en las vesículas-PIP3 que se transportan a lo largo del axón lo cual sugiere un papel de mantenimiento de la identidad axonal (Horiguchi et al. 2006).

Otras evidencias de la importancia de la actividad de PI3K en el proceso de diferenciación axonal se infieren del efecto de la sobreexpresión o la inhibición de proteínas que regulan la actividad de PI3K en sí misma o varias de las dianas de PI3K-Akt. Por ejemplo, la sobreexpresión de PTEN inhibe la aparición del axón (Jiang et al. 2005; Shi et al. 2003) mientras que su supresión con ARN de interferencia da lugar a la aparición de múltiples axones (Jiang et al. 2005). También otra proteína regulada por PI3K y que es capaz de activar Akt (Delcommenne et al. 1998), ILK (*Integrin-linked kinase*) sigue esta misma dinámica (Guo et al. 2007).

En el **esquema 2** se resume la vía de activación de IGF1R-PI3K con las principales dianas de PI3K y Akt, uno de sus principales sustratos.



Esquema 2. Resumen de las proteínas modificadas por las vías de señalización de Insulina/IGF-1. El esquema representa la ruta de señalización por PI3K tras la unión del agonista (IGF1) a su receptor (IGF1R) y los principales eventos que se desencadenan. Entre ellos, la activación de las rutas de MAPK, del complejo Par3/Par6 asociado a la dinámica de actina y la de Akt. La vía de PI3K está implicada en funciones celulares tan importantes como la dinámica de actina y tubulina, la expresión génica, el metabolismo y la supervivencia celular.

Akt.

La generación de PIP3 permite el anclaje en la membrana a proteínas que contienen un dominio, denominado PH (*Plecstrin Homology*) de interacción con estas moléculas. Una de las proteínas que es reclutada en la membrana plasmática tras la activación de PI3K es Akt. Akt, también denominada PKB, constituye una familia de proteínas con tres miembros Akt1, Akt2, Akt3 que presentan actividad Ser/Thr quinasa. Aunque no se ha determinado el papel diferencial de cada isoforma en las dianas de la actividad quinasa de Akt, presentan especificidad de acción dado el fenotipo diferencial observado con la supresión de cada una de ellas en ratones KO (revisado en (Manning and Cantley 2007)).

La translocación de Akt a la membrana es esencial para su doble fosforilación por la cual la enzima se activa. La fosforilación de Akt tiene lugar en dos residuos, Thr³⁰⁸ llevada a cabo por la quinasa PDK1 y Ser⁴⁷³ que tiene lugar por la PDK2 (principalmente parece ser responsable el complejo mTORC2). Otras quinasas capaces de fosforilar Akt en el residuo Ser⁴⁷³ son la quinasa ILK que responde a la activación de integrinas (Delcommenne et al. 1998), MAPK o PKCα. Se ha descrito que la fosforilación de Akt en el residuo de Ser⁴⁷³ estabiliza su dominio catalítico. Además, formas de Akt parcialmente fosforiladas presentan una activación parcial que corresponde al 20% de su actividad total (Manning and Cantley 2007). Una vez activada, Akt se disocia de la membrana y fosforila numerosos sustratos en el citoplasma y el núcleo. Muchos de los sustratos de Akt presentan una

secuencia consenso de fosforilación RXRXX(S/T), el número de sustratos sigue en aumento. Especialmente en cerebro, es necesario ahondar en la investigación de los papeles de Akt en el desarrollo neuronal.

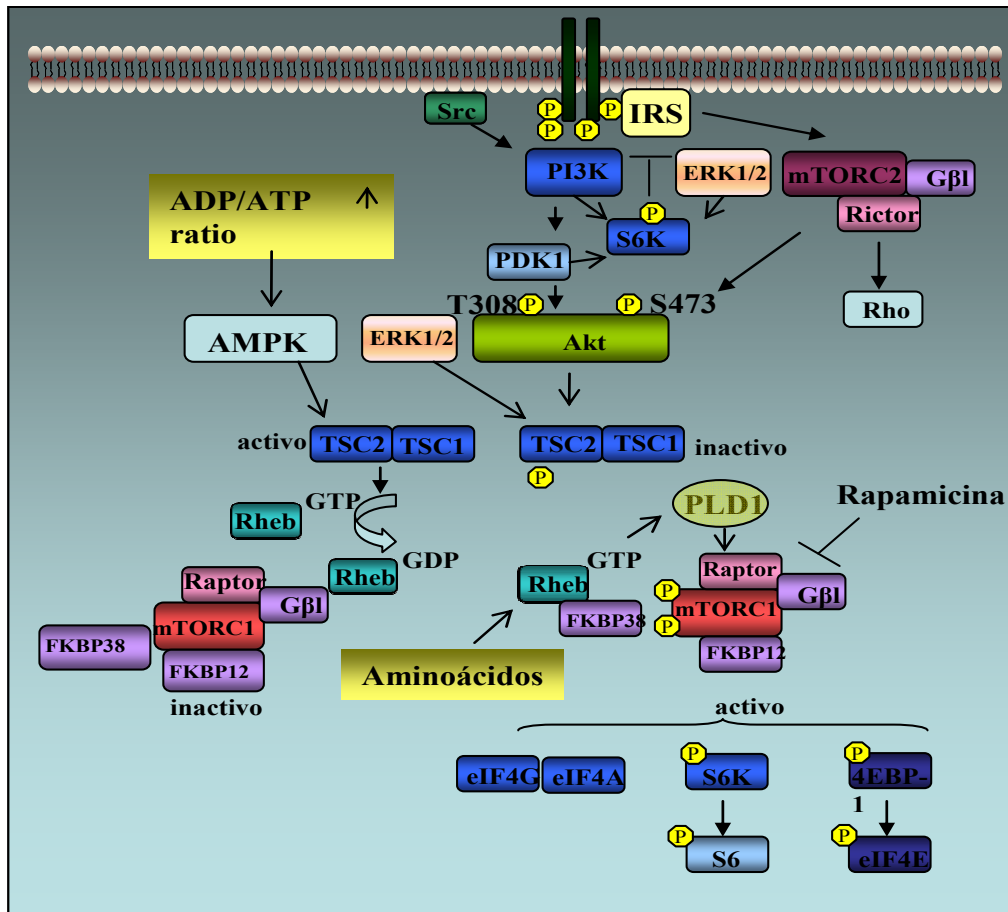
Activación de la ruta mTORC1.

Entre los sustratos de Akt se encuentran la proteína TSC2 que se encuentra asociada en un heterodímero con TSC1 (*tuberous sclerosis complex*) (ver **Esquema 3**) (Inoki et al. 2002; Manning et al. 2002; Potter et al. 2002). Estas proteínas se encuentran, en situación basal, formando un complejo con Rheb (*Ras homolog enriched in brain*). Rheb es una proteína intercambiadora de GDP/GTP similar a la proteína oncogénica Ras altamente conservada en la evolución. La unión del dímero TSC1/TSC2 con la proteína Rheb mantiene a esta última inhibida (unida a GDP). La actividad de Rheb es dependiente de la farnesilación en su extremo C-terminal la cual le dirige a la membrana plasmática (Castro et al. 2003). Se han descrito varias mutaciones que generan una activación constitutiva de Rheb, mutaciones equivalentes a las descritas previamente para la proteína Ras. Entre ellas, la sustitución del residuo de glutamato 64 por leucina, RhebQ64L, (Jiang and Vogt 2008), que genera una proteína Rheb unida a GTP en un porcentaje del 90% y cuya actividad potenciada puede inferirse por una mayor actividad del complejo mTORC1.

Con la fosforilación que efectúa Akt sobre TSC2 (en Ser⁹³⁹, Ser¹¹³⁰ y Thr¹⁴⁶², Wu et al 2007) queda inhibida su actividad GAP, Rheb queda en forma Rheb-GTP y modula la actividad del complejo mTORC1 (Inoki et al. 2002), (Tee et al. 2002), (Jaeschke et al. 2002) con el que interacciona directamente (Long et al. 2005). Se ha sugerido que dicha activación de mTORC1 ocurre por el desplazamiento de la unión de inhibidores a éste, como FKBP38, tras la asociación con Rheb-GTP (Bai et al. 2007).

Las proteínas TOR funcionan formando parte de dos complejos conservados en la evolución: el complejo mTORC1 (formado por TOR-raptor-mLST8/GβL) que es sensible a inhibición por rapamicina (Kim et al. 2002), (Kim et al. 2003), y el complejo mTORC2 (TOR-rictor-mSIN1-mLST8/GβL) que no es bloqueado por un tratamiento agudo con rapamicina (Loewith et al. 2002). Este último, como se ha indicado en el apartado anterior, se postula como principal responsable de la fosforilación en el residuo de Ser⁴⁷³ de Akt.

La consecuencia principal de la activación de mTORC1 es la fosforilación de las proteínas ribosomales S6K1 y S6K2 (Kim et al. 2002) y de proteínas de unión al factor de iniciación eucariótico eIF4E (4EBPs). En conjunto, estas modificaciones dan lugar a un aumento en la síntesis de proteínas por una mayor eficiencia en la traducción de mensajeros de ARN ricos en bases púricas. La activación de la proteína S6K además también puede ser llevada a cabo de forma directa por fosforilación por PI3K o MAPK, entre otras, en residuos diferentes a los fosforilados por mTORC1.



Esquema 3. Resumen de las regulaciones propuestas a través de Akt y la activación de mTORC1 a partir de datos procedentes de diferentes tipos celulares. En el esquema se muestra la activación de Akt por fosforilación en sus dos residuos reguladores como resultado de la actividad del complejo mTORC1 y de PDK1. La fosforilación de la proteína TSC2 por Akt da lugar a la estimulación de Rheb y de mTORC1. Entre las principales funciones reguladas por Rheb/mTORC1 se encuentra la supervivencia celular, la eficiencia en la traducción de proteínas, el tamaño del soma celular o la posibilidad de la regulación de la extensión neurítica.

Es controvertida la regulación negativa que ejerce la actividad de S6K sobre la vía por efectos contradictorios observados en función del tipo celular. Sin embargo, parece claro que en algunos tipos celulares de origen tumoral la actividad de S6K inhibe la activación de IRS y la actividad de mTORC1 se ve disminuída como consecuencia de ello (Manning and Cantley 2007).

Los efectos de la activación de la vía de mTORC1 son por un lado el aumento del soma celular (Kwon et al. 2003) y por otro, un mayor aprovechamiento energético. Además de incrementar la eficiencia de la síntesis de proteínas se ha descrito en concreto una mayor tasa de producción de proteínas en dendritas (Takei et al. 2004). Más recientemente, se han publicado una serie de artículos en los que se analiza el efecto de la activación de mTORC1 sobre la dinámica de microtúbulos (Jiang and Yeung 2006) que podría resultar en una mayor eficiencia en la regeneración axonal en un modelo de lesión realizado en neuronas *in vivo* (Park et al. 2008). En otro trabajo reciente, se relaciona la capacidad de mTORC1 para modificar la dinámica de microtúbulos con la posible disminución (directa o indirecta)

de la actividad de la RhoK o la implicación de la ruta TSC/mTORC1 en polaridad neuronal (Choi et al. 2000; Choi et al. 2002; Morita and Sobue 2009; Park et al. 2008).

GSK3.

La actividad de Akt modula entre otras muchas la actividad de la proteína glucógeno sintasa quinasa 3 α/β (*Glycogen Synthase Kinase 3*, GSK3 α/β) que tiene también actividad Ser/Thr-quinasa (Cross et al. 1995). La enzima glucógeno sintasa quinasa 3 presenta dos isoformas, GSK3 α (51 KDa) y GSK3 β (47 KDa), ambas expresadas de forma ubicua en el organismo de mamíferos y abundantemente en cerebro, de manera mayoritaria la isoforma β (Woodgett 1990). Están codificadas por diferentes genes y aunque comparten un 97% de su secuencia entre ellas, difieren principalmente en el extremo N-terminal, siendo en la isoforma GSK3 α más largo y rico en glicinas. Producto de un procesamiento diferente durante la transcripción todavía no bien conocido, pueden encontrarse fragmentos correspondientes a GSK3 β de un tamaño menor ($\beta 1$ y $\beta 2$) (Mukai et al. 2002) (Schaffer et al. 2003).

La fosforilación de GSK3 por Akt en el residuo Ser⁹ en GSK3 β o Ser²¹ en GSK3 α induce un cambio conformacional en la proteína que se traduce en la inactivación de la misma (Frame and Cohen 2001; Sutherland et al. 1993). Puesto que la actividad de GSK3 es dependiente de su estado de fosforilación existen numerosos estudios acerca de las vías que median dicha fosforilación. La ruta predominante en neuronas parece ser la activada en respuesta a factores de crecimiento tipo insulina/IGF-1, que cómo se ha descrito anteriormente estimula la ruta de PI3K/Akt. Pero además de Akt, existen otras quinasas que fosforilan a GSK3 en serina en diferentes tipos celulares, entre ellas, p90Rsk, PKCa, p70S6K, ILK (Frame et al. 2001). Sin embargo, sigue siendo desconocida la quinasa responsable de la fosforilación en tirosina de GSK3 en mamíferos, asociada a una mayor actividad quinasa (Hughes et al. 1993).

Hay datos suficientes para situar a GSK3 por debajo de la señalización mediada por PI3K en la determinación de la formación y elongación del axón. Por ejemplo, la sobreexpresión de GSK3 β S9A, forma constitutivamente activa de GSK3, suprime la generación de múltiples axones generados por la sobreexpresión de ILK (Guo et al. 2007), la expresión de Akt-myr, forma activa de Akt (Juang et al. 2005) o la supresión de la expresión de PTEN en neuronas (Jiang et al. 2005).

La enzima GSK3 tiene un papel crítico durante el desarrollo embrionario, resultando en letalidad embrionaria la carencia de GSK3 β en ratón (Hoeflich et al. 2000). Pero además ejerce control sobre muchos procesos celulares en adulto, por ejemplo, regula el metabolismo de lípidos y glucógeno (Embi et al. 1980), la expresión génica y la respuesta proliferativa, la dinámica del citoesqueleto o el proceso de apoptosis entre otros (Frame and Cohen 2001).

La distribución de GSK3 en las neuronas es amplia encontrándose no sólo en citoplasma y núcleo sino también en zonas de crecimiento de neuritas en donde participa regulando el proceso de formación y elongación/retracción de las mismas.

En neuronas, la activación de GSK3 da lugar a la retracción de los procesos neuríticos, mientras que su inhibición produce la elongación axonal. Sin embargo, es esencial el balance correcto de actividad de GSK3 y el momento en el que esta inhibición se produce puesto que la presencia de inhibidores de GSK3 desde el inicio del desarrollo de la neurona impide por completo la aparición del axón.

Se ha observado actividad quinasa de GSK3 en respuesta a diferentes situaciones en células neuronales como la exposición a LPA (ácido lisofosfatídico) (Sayas et al. 2002) o a semaforina 3^a (Uchida et al. 2005).

La distribución de las diferentes formas de GSK3 en función de su estado de fosforilación parece estar determinado por los estímulos extracelulares recibidos. Así por ejemplo, en líneas neuronales la fracción GSK3-PTyr^{216/279} se encuentra asociada a focos de adhesión con las proteínas actina y vinculina, consistente con su papel en retracción de neuritas. Sin embargo, la llegada de un compuesto inductor de muerte celular favorece su translocación al núcleo rápidamente y la potenciación del efecto proapoptótico del compuesto (Bhat et al. 2000) por lo cual se sugiere una función en muerte celular de la GSK3 presente en el núcleo, aunque es un punto que sigue bajo controversia. En condiciones normales la proteína se encuentra fosforilada en tirosina y es la llegada de factores de crecimiento y estimulación de la vía PI3K la que inactiva GSK3 por fosforilación en serina.

La enzima GSK3 se encuentra activada o carente de inhibición en muchas de las enfermedades que se presentan con alta incidencia en la población, como algunos tipos de cáncer, diabetes o enfermedades que comprometen al sistema nervioso como esquizofrenia, esclerosis múltiple, Huntington, Alzheimer o Parkinson. También se observa un aumento en la actividad quinasa de GSK3 tras un proceso isquémico en el cual la activación de GSK3 se asocia con la aparición de apoptosis. Esto ha llevado a la idea de utilizar compuestos sintéticos capaces de inhibir la actividad quinasa de GSK3 con fines terapéuticos (Bhat et al. 2004).

Dada la participación de la GSK3 en diversos procesos celulares la regulación de su actividad resulta de gran importancia. De ahí que su regulación sea compleja. La GSK3 se regula por su estado de fosforilación (PSer^{9, 21} asociado con menor actividad quinasa, PTyr^{216, 279} asociado con mayor actividad). Se han descrito otras fosforilaciones sobre GSK3 en otros residuos como el residuo Thr390 llevado a cabo por p38MAPK (Thornton et al. 2008), por su localización intracelular (citoplasma, núcleo, citoesqueleto), por procesamiento proteolítico realizado por calpaínas (Goni-Oliver et al. 2007) o bien por asociación a otras proteínas.

El papel de GSK3 en polaridad neuronal puede deberse a su acción sobre varias proteínas implicadas en la estabilización del citoesqueleto, como proteínas de asociación a microtúbulos (MAPs: tau (Sperber et al. 1995), MAP1B (Gonzalez-Billault et al. 2004), APC (Shi et al. 2004), CRMP2 *collapsin response mediator proteins* (Cole et al. 2006) o CLASP2, *CLIP associated protein 2* (Watanabe et al. 2009). En condiciones normales, GSK3 fosforila varias proteínas de unión a microtúbulos (MAPs: *microtubule associated proteins*), promoviendo la estabilización de los mismos. Entre estas proteínas destacan la proteína MAP1B con su función en migración neuronal y

axonogénesis (Gonzalez-Billault et al. 2005) y la proteína tau cuya hiperfosforilación se observa en diferentes enfermedades neurodegenerativas (Avila et al. 2004; Bhat et al. 2004; Plattner et al. 2006; Takahashi et al. 1994) (Hernandez and Avila 2007).

Otro de los sustratos de GSK3 es la proteína β -catenina (Ikeda et al. 1998). Tanto la GSK3 como la β -catenina forman parte de otra de las principales vías intracelulares de señalización, la ruta de las proteínas Wnt.

Vía de señalización de proteínas WNT.

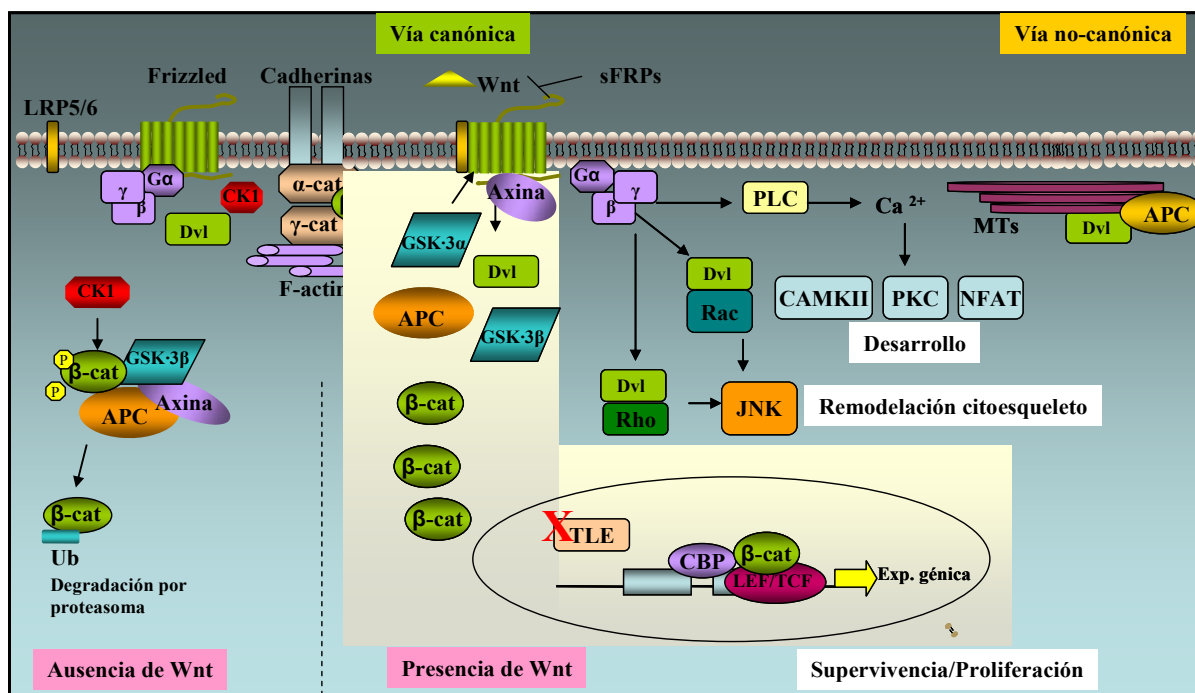
La vía de señalización mediada por proteínas Wnt está presente en todos los organismos y altamente conservada a lo largo de la evolución. Adquiere gran importancia en el desarrollo embrionario con un papel importante en el establecimiento de la polaridad dorso-ventral y las características del eje axial en larvas de *Drosophila*, y oocitos de *Xenopus* (Cadigan and Nusse 1997; Shimizu et al. 1997).

Se han identificado 19 genes que codifican para proteínas Wnt, de las que se han descrito más de 20 tipos en mamíferos. Éstas son proteínas pequeñas de 20 aminoácidos glicosiladas y secretadas al medio extracelular. Son expresadas y liberadas durante el desarrollo neuronal y por neuronas y glía en el cerebro adulto. Se ha observado que estas proteínas ejercen un efecto neuroprotector y la expresión de varias de ellas, por ejemplo Wnt3a y Wnt7a coincide con la maduración, extensión axonal y la formación de sinapsis durante el desarrollo del Sistema Nervioso Central en el ratón (Lucas and Salinas 1997; Salinas et al. 1994). Uno de los efectos descritos en neuronas granulares inducidos por la proteína Wnt7a mediante la inhibición de la GSK3 es la ramificación y remodelación axonal (Lucas and Salinas 1997). La desregulación de esta vía en el Sistema Nervioso Central se ha asociado en algunos estudios clínicos con enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer, donde se presenta una disminución en la señal Wnt/ β -catenina (De Ferrari and Moon 2006; Inestrosa and Toledo 2008).

Las proteínas Wnt reconocen en la membrana plasmática el extremo N-terminal de receptores de 7 dominios transmembrana denominados Frizzled (1-10) (Bhanot et al. 1996; Yang-Snyder et al. 1996), que a su vez interaccionan con un coactivador del receptor denominado LRP (lipoprotein-receptor protein) de un paso transmembrana del que existen dos isoformas, LRP5 y LRP6 (*low density lipoprotein related protein 5/6*). (**Esquema 4**).

Existen otras proteínas implicadas en la transducción de esta señal desde la membrana como Ryk o Ror2, receptores tirosina-quinasa (revisados en (Angers and Moon 2009)).

La activación de la vía “canónica” de Wnt da lugar, fundamentalmente, a la estabilización de la proteína β -catenina por inhibición de GSK3. Entre las proteínas Wnt que desencadenan esta señalización se encuentran Wnt1, 3, 3-a y 8 (Miller and Moon 1997; Nusse 1997). Existe una serie de respuestas (vías “no-canónicas”) en las que no es necesaria la intervención de la función de β -catenina y que se caracterizan por la activación de proteínas G heterotriméricas en función de los tipos de proteínas Wnt presentes (entre ellas las proteínas Wnt4, 5a y 11).



Esquema 4. Resumen de las vías de señalización activadas por las proteínas Wnt. En el esquema se representan las vías de activación clasificadas como “canónicas”, aquellas que implican la estabilización de β-catenina, y “no-canónicas” las que siguen a la activación de proteínas G heterotriméricas que dan lugar a la movilización de calcio (por activación de PLC) o la modulación de la estabilidad del citoesqueleto (mediante la interacción de Dvl con los microtúbulos y la actividad de Rho/JNK) (Rosso et al. 2005). En la ruta canónica (remarcada), la unión de Wnt a su receptor da lugar a varios eventos casi simultáneos: la fosforilación y translocación de la proteína dishevelled (Dvl) a la membrana plasmática, la fosforilación transitoria de LRP5 mediada por GSK3α acompañada por la inhibición de la actividad quinasa de GSK3β y defosforilación de Axina por PP2A y su posterior degradación. El complejo formado inicialmente es dependiente de la fosforilación de Axina y se desensambla. Con la disociación del complejo, β-catenina se estabiliza. Esto conlleva la translocación al núcleo de la misma y formación de los complejos con la familia de proteínas TCFs sobre la secuencia específica en el ADN en los que ejerce su función de coactivador de la expresión génica (Wodarz and Nusse 1998). La vía de Wnt controla eventos importantes como la especificación de linajes celulares durante el desarrollo, proliferación, supervivencia y transmisión sináptica.

Estructura de β-catenina.

La estructura de β-catenina consiste principalmente en 3 dominios: la región N-terminal (134 aminoácidos), la región central (550 aminoácidos) y la región C-terminal (100 aminoácidos) en la que se encuentra la zona de unión a coactivadores de la transcripción. Presenta la capacidad de unirse a muchas otras proteínas, tanto en citosol como en núcleo y membrana, para lo cual requiere de unas regiones altamente conservadas en la evolución denominadas “repeticiones armadillo” (por su identificación en el homólogo de β-catenina de *Drosophila*, Armadillo) que se distribuyen a lo largo de la secuencia de la proteína mayoritariamente en la región central y el extremo C-terminal. Estas regiones se componen de unos 40 aminoácidos que forman 3 hélices α y suelen encontrarse repetidos en tándem, en el caso de β-catenina se encuentran 12 repeticiones de estas características, pero

también se encuentran repeticiones “armadillo” en algunos de sus compañeros como TCF/LEF o APC a través de los cuales interaccionan.

Localización, regulación y función de β -catenina.

La β -catenina es una proteína multifactorial, que puede encontrarse en diversos complejos proteicos según su localización subcelular. En la membrana, tiene una función en el mantenimiento de la morfología y la adhesión celular gracias a su interacción con la proteína transmembrana N-cadherina. En este complejo también se hallan la α -catenina y filamentos de actina que fijan la estructura a lo largo de la membrana. En algunos trabajos se ha descrito que la β -catenina localizada en membrana se encuentra defosforilada en residuos de tirosina (Roura et al. 1999).

En el citoplasma, la β -catenina forma otro complejo multiproteico con Axina, Caseína quinasa I (CKI), APC y GSK3 β (Bienz and Clevers 2000; Hart et al. 1998). En este complejo, la enzima CKI fosforila el residuo de Thr-45 del extremo N-terminal de la β -catenina facilitando así su fosforilación secuencial por la GSK3 en los residuos Thr-41, Ser-37, Ser-33. El primado de la β -catenina por la caseína-quinasa I (CKI) no es necesario como se destaca en algunos estudios realizados en células de cáncer de colon, aunque sí favorece la fosforilación posterior (Wang et al. 2003b). Esta hiperfosforilación de la β -catenina hace que sea reconocida por β -TrCp-E3 ubiquitina-ligasa que dirige a la proteína hacia el proteosoma para su degradación (Aberle et al. 1997; Kitagawa et al. 1999).

La unión de las proteínas N-cadherina o axina a la β -catenina es mutuamente excluyente, puesto que ambas proteínas tienen un sitio de unión a β -catenina parcialmente solapante sobre varias de sus repeticiones armadillo.

Recientemente se ha observado que la sobreexpresión de β -catenina en neuronas de hipocampo adultas tiene la capacidad de potenciar la arborización dendrítica y el aumento de la densidad de espinas dendríticas. Este efecto se consigue de una manera no-dependiente de transcripción mediada por β -catenina/TCFs sino a través de su localización en membrana mediante la interacción con N-cadherina y la estabilización del citoesqueleto de actina en las extensiones neuronales (Yu and Malenka 2004). Tanto la β -catenina como la N-cadherina se encuentran distribuidas a lo largo del axón y en las dendritas en el desarrollo inicial de la neurona y concentradas en los puntos de contactos sinápticos axón-dendríticos y espinas, colocalizando con proteínas sinápticas en neuronas maduras (Murasu et al. 2002). El control de los niveles de la β -catenina es importante puesto que cuando se estabiliza en el citosol es capaz de translocarse al núcleo. Dado que no posee en su secuencia una señal de localización nuclear, se ha sugerido en varios trabajos que lo consiga formando un complejo con alguna otra proteína entre las que se baraja la proteína Axina (Cong and Varmus 2004; Varmus 2004) o 14-3-3 ζ (Tian et al. 2004).

Una vez en el núcleo, la β -catenina se asocia a través de su dominio C-terminal, con coactivadores de la transcripción de la familia de los factores de transcripción de alta movilidad (caja HMG: *high mobility group box*): TCF/LEF (*T-Cell factor*, *Lymphoid enhancer factor*, por su descripción inicial en este tipo celular): TCF1, LEF1, TCF3 y TCF4. Estos factores de transcripción interaccionan con el

surco menor del ADN y reconocen una secuencia específica (5'-CCTTTGATC-3') (Travis et al. 1991; Waterman et al. 1991). Necesitan de la unión de la β -catenina para iniciar el proceso de transcripción, del mismo modo que la β -catenina no puede iniciar el proceso por sí porque carece de sitio de unión al ADN (Behrens et al. 1996). En ausencia de β -catenina nuclear, las proteínas TCFs se pueden encontrar tanto en citoplasma como en núcleo, en donde parece ser mayoritaria su presencia. En el núcleo en reposo, las TCFs pueden encontrarse asociadas a las secuencias específicas del ADN pero formando un complejo con inhibidores de transcripción, por ejemplo proteínas de la familia TLE (vertebrados)/Groucho (*Drosophila*) (Brantjes et al. 2001; Daniels and Weis 2005) (Brantjes et al. 2002).

Los genes que responden a la formación del complejo β -catenina/TCFs son, entre otros, genes que favorecen la diferenciación de precursores neuronales (neurogenina 1 (Hirabayashi et al. 2004), supervivencia celular y proliferación (c-myc (He et al. 1998), (Shtutman et al. 1999)), importante también en cerebro para el caso de glía y precursores neuronales. Entre los genes cuya expresión se ve potenciada por β -catenina/TCF se encuentran los correspondientes a inhibidores de la propia ruta como es el caso del PPAR γ (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ*) un receptor nuclear capaz de inducir la degradación de la β -catenina y de inhibir la expresión de la misma en diferentes tipos celulares (Sharma et al. 2004), o el aumento de expresión del gen de la proteína Dickkopf-1 que es secretada al medio extracelular e inhibe la señalización de las proteínas Wnt induciendo la endocitosis de los co-receptores LRP5/6 (Gonzalez-Sancho et al. 2005).

La salida del núcleo de la β -catenina debe estar asimismo regulada de manera precisa. Se trata de un proceso poco conocido en el que se han situado proteínas como APC (Rosin-Arbesfeld et al. 2003) o Axina (Krieghoff et al. 2006) como responsables de la retención de la β -catenina en el compartimento donde interaccionan. En otros trabajos se describe la capacidad de la β -catenina para abandonar el núcleo de una manera independiente del mecanismo de exportación nuclear mediado por el receptor nuclear CRM-1 (*chromosome maintenance region 1*) y de Ran-GTPasa haciéndolo a través de sus repeticiones de armadillo (Fagotto et al. 1998).

Puesto que los genes regulados por β -catenina /TCFs son genes de proliferación en células con capacidad de división, no-neuronales, se ha estudiado ampliamente la regulación de β -catenina por su implicación directa o de sus proteínas reguladoras (APC, Axina principalmente) en numerosos tipos de cáncer (Grodén et al. 1991; Miyoshi et al. 1992; Morin et al. 1997; Rubinfeld et al. 1997).

La proteína β -catenina también puede sufrir procesamiento proteolítico por calpaínas (Benetti et al. 2005; Rios-Doria et al. 2004). En varios trabajos realizados en líneas celulares de origen tumoral se describe un fragmento de β -catenina de 75 KDa (la proteína entera es de 92 KDa) producto de corte por calpaína que potencia, en términos de duración temporal, la transcripción mediada por β -catenina.

Además de la vía de PI3K, se han descrito otras rutas con un papel importante en la determinación/elongación axonal. Entre ellas, la formación del complejo Par3/Par6/PKCα. Este complejo aparece enriquecido en el axón emergente de las neuronas de hipocampo en estadio 3 y la sobreexpresión de formas truncadas de Par3 o Par6 impide la aparición del axón (Shi et al. 2003). La actividad de PKCα está regulada en este complejo por la asociación con Par6 (Yamanaka et al. 2001). La localización del complejo Par3/Par6/PKCα en el axón tiene lugar por la asociación de Par3 con la quinesina KIF3A (Nishimura et al. 2004). Otra de las proteínas que interaccionan con este complejo es la proteína intercambiadora de GDP por GTP, Tiam1 que ejerce de GEF (Guanine nucleotide-exchange factor) para Rac1 (Kunda et al. 2001), (Nishimura et al. 2005). Este dato junto con la interacción de Par3/Par6 con p190RhoGAP, que es una proteína GAP (GTPase activating protein) específica de RhoA sugiere la posibilidad de que Par3/Par6 ejerzan de andamiaje para las principales GTPasas (RhoA, cdc42, Rac) (Zhang and Macara 2008).

Los principales ejecutores de las diferentes vías de señalización con efecto sobre la elongación de neuritas son proteínas que modulan el citoesqueleto de tubulina (MAPS, otras proteínas de interacción a tubulina) o de actina. Entre estas últimas, las principales son las proteínas que pertenecen a la familia de Rho-GTPasas: Rho, Rac y cdc42 entre otros miembros. La actividad de estas proteínas determina la polimerización y despolimerización de los filamentos de actina.

Elongación/Retracción axonal. GTPasas de la Familia de Rho.

Las proteínas GTPasas de la familia Rho, de las que hay descritos más de 20 miembros (Jaffe and Hall 2005) modifican la dinámica del citoesqueleto de actina y el patrón de polimerización de ésta. Además regulan la coordinación del citoesqueleto de actina y tubulina (Sayas et al. 2002).

Los principales miembros de la familia por su función en morfología neuronal pueden reducirse a RhoA, Rac, Cdc42. Su actividad es dependiente de la conversión de GDP (forma inactiva) a GTP (forma activa) efectuada entre otros por miembros de la familia Dbl (GEFs, guanine nucleotide exchange factors). La conversión inversa, GTP por GDP, y por tanto la inactivación de los miembros de Rho GTPasas tiene lugar por proteínas GAPs (GTPase activating proteins).

La actividad de las Rho-GEFs y las Rho-GAPs son moduladas por diferentes vías de señalización, entre las que se encuentra la mediada por la proteína PI3K. La inhibición de PI3K en neuronas con un axón desarrollado da lugar a un aumento de la actividad de Rho y una disminución de la de Rac induciendo el colapso del cono de crecimiento y la retracción axonal. Diversos estudios muestran cómo la inhibición de la actividad de Rho resulta tener un efecto positivo en la elongación de neuritas (Da Silva et al. 2003).

Entre los principales efectores dependientes de la actividad de RhoA se encuentra la enzima RhoK. Aunque presenta muchos sustratos (Riento and Ridley 2003) una de las dianas de RhoK es el intercambiador de GTP/GDP de Rac, Tiam1 (GEF). Tiam1 se asocia a los microtúbulos y juega un

papel crucial en el desarrollo axonal (Kunda et al. 2001). Otro de las principales dianas de RhoK es la proteína Par3, que al fosforilarse promueve el desensamblaje del complejo formado por Par3/cdc42. Mediante estos mecanismos quedan interrelacionados los principales miembros de la familia RhoGTPasas (Rho, Rac, cdc42) cuyo balance determinará el comportamiento del cono de crecimiento de las neuritas.

2. Estrógenos.

Los estrógenos pertenecen al grupo de moléculas naturales denominadas hormonas sexuales. Inicialmente se les atribuyó el término “hormonas sexuales femeninas”, sin embargo, se encuentran presentes en ambos sexos en cantidades elevadas en el plasma circulante. Los estrógenos y sus receptores ejercen efectos muy variados en el organismo que no sólo se restringen a funciones relacionadas con la reproducción ya que son múltiples sus tejidos diana (el tejido óseo, el corazón, el Sistema Vascular y el Sistema Nervioso Central y Periférico entre otros).

Existen varios tipos de estrógenos naturales con diferentes cantidades relativas en plasma. Los más abundantes son por este orden: 17- β -estradiol, estrona y estriol, siendo este último un producto de oxidación de los dos anteriores. Tanto en el hombre como en la mujer la presencia de estrógenos en el torrente sanguíneo se debe, no sólo a la secreción directa desde las gónadas (testículo, ovario/corteza suprarrenal), sino también a la conversión en tejidos periféricos de la testosterona y sus precursores en estradiol.

2.1. Ruta de síntesis y metabolismo de estradiol.

La síntesis de 17- β -estradiol tiene lugar a partir del colesterol. En el cerebro se ha determinado que tanto glía como neuronas son capaces de producir estradiol gracias a que ambos tipos celulares contienen los componentes básicos de su ruta de síntesis.

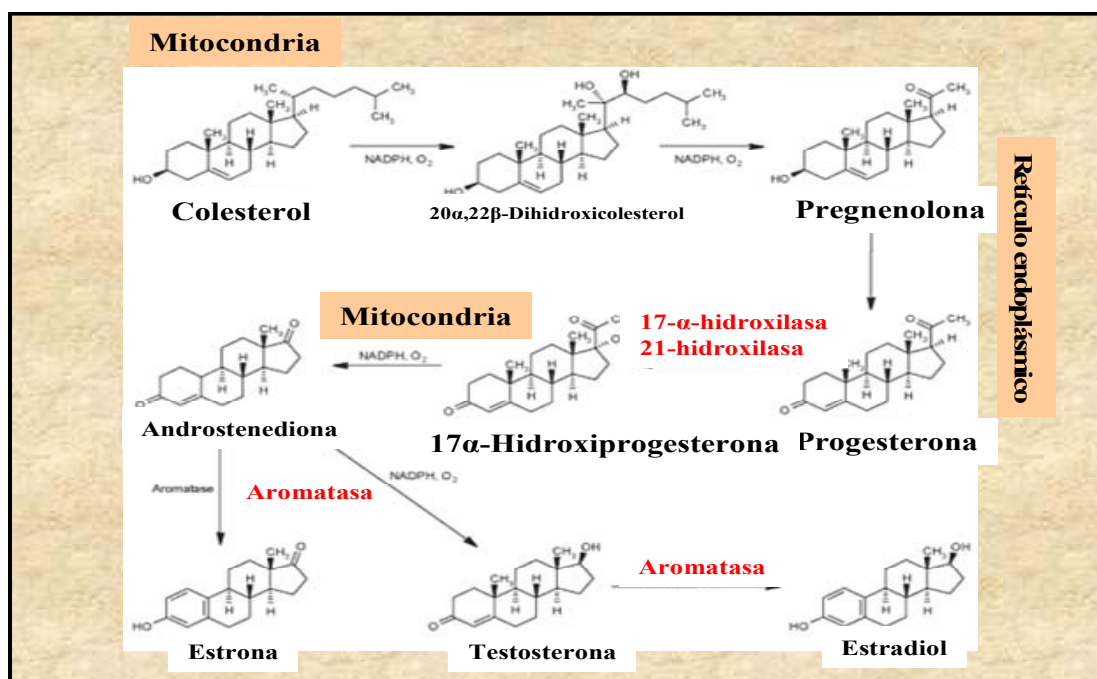
A pesar de que los esteroides atraviesan la barrera hematoencefálica y penetran en el tejido cerebral, parece ser la síntesis local de estrógenos en puntos concretos del cerebro la que determina finalmente la respuesta mediada por éstos (Mukai et al. 2006).

La síntesis local de estradiol en el cerebro y su actuación en el mismo hacen que el estradiol se englobe dentro de los denominados “neuroesteroides”, término utilizado por primera vez por el grupo de Baulieu (Robel and Baulieu 1994). Este grupo observó que la presencia de varios de los precursores de los estrógenos, pregnenolona y dehidroepiandrosterona, estaban presentes tanto en cerebro procedente de adulto hembra y macho de ratón en cantidades de hasta 20 veces superiores a los niveles encontrados en plasma. Parece claro, por los datos recopilados en diferentes laboratorios, que existe una regulación de la síntesis de estradiol interna en el tejido cerebral pudiendo sintetizarse en neuronas de hipocampo de rata a partir de la pregnenolona (Hojo et al. 2004). De estos análisis se podría pensar que existe una alta concentración en hipocampo tanto de 17- β -estradiol como de su enantiómero 17- α -

estradiol (900 pg/mg de proteína en machos) (Toran-Allerand 2005) Este hecho es importante a la hora de estudiar la influencia de los estrógenos en procesos neuronales o en funciones de aprendizaje. Resulta de gran interés la implicación de la síntesis local de estradiol en el hipocampo en procesos de memorizaje (Kretz et al. 2004; Murakami et al. 2006) sin embargo son estudios que requieren un análisis mayor por los datos enfrentados obtenidos con ratones deficientes de la enzima aromatasa que no parecen presentar déficit en la memoria espacial (Boon et al. 2005).

A lo largo de la ruta de síntesis de estradiol (**Esquema 5**), las enzimas implicadas se encuentran en diferentes compartimentos celulares, la mitocondria y el retículo endoplásmico. Esta peculiaridad confiere a la ruta una mayor regulación de la obtención del producto final ya que requiere un buen funcionamiento de ambos compartimentos.

Uno de los puntos clave que determinan la formación de estradiol es la disponibilidad de colesterol en la membrana interna mitocondrial que pueda en esta localización ser transformado en pregnenolona y así iniciar la ruta de síntesis. El resto de los pasos de la ruta de síntesis tiene lugar en el retículo endoplásmico.



Esquema 5. Ruta de síntesis de 17-β-estradiol. El inicio de la síntesis de estradiol tiene lugar en el interior de la membrana mitocondrial con la formación de pregnenolona a partir de colesterol. Este compuesto va a ser procesado en la membrana del retículo endoplasmático hasta dar progesterona en dos reacciones químicas (transformación de grupo hidroxilo a cetona e isomerización). La progesterona es la precursora de testosterona que tras varias reacciones químicas finalmente se aromatiza para dar lugar a estradiol, papel que ejerce la enzima aromatasa.

La enzima determinante de la producción de estradiol es la encargada del último paso de la ruta de síntesis, es decir, la citocromo-P450 aromatasa que se encuentra localizada en el retículo

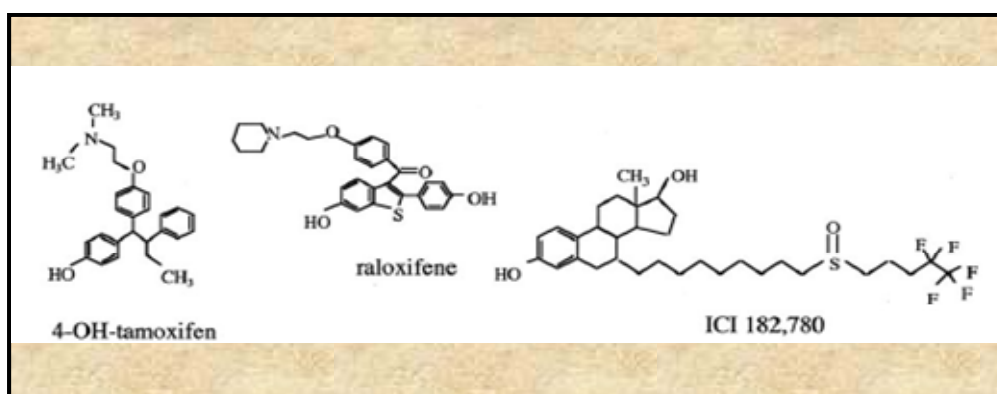
endoplásmico. Esta enzima es expresada tanto en astrocitos como en neuronas como se ha descrito recientemente para las neuronas piramidales de la corteza temporal humana (Yague et al. 2006).

Por último, la eliminación de estrógenos del plasma circulante tiene lugar tras un procesamiento en hígado, por el cual estradiol se convierte rápidamente en estrona (por acción de la enzima 17-hidroxiesteroide deshidrogenasa). Aunque parte de esta estrona recién formada vuelve a la circulación, la mayor parte se metaboliza dando lugar a 16-hidroxiestrona, que se transforma en estriol, o bien 2 o 4-hidroxiestrona (estrógeno catecol) (Pikuleva 2006).

2.2. Antagonistas estrogénicos.

La presencia de estrógenos en concentraciones elevadas, la sobreexpresión o falta de regulación de los receptores de estrógenos o bien la desregulación de los efectos que éstos producen en supervivencia y proliferación celular viene acompañada en algunos casos de la aparición de tumores que responden a la presencia de estradiol. Los tumores con respuesta a estrógenos pueden ser de origen muy diverso: colon, mama, pulmón, ovario, testículo entre otros.

Como estrategia terapéutica para suprimir o reducir el crecimiento de tumores capaces de responder a estrógenos se han sintetizado varios compuestos que inhiben la actividad aromatasa (revisado en (Brueggemeier et al. 2005)) o que son antagonistas de los receptores de estrógenos. Los antagonistas de los receptores de estrógenos se clasifican como “puros” o “no puros” en función de las actividades celulares que se han relacionado tras su unión a los receptores de estrógenos a través del dominio de unión al ligando (Gustafsson 1998; Hanstein et al. 2004) (Katzenellenbogen and Frasor 2004; Meegan and Lloyd 2003).



Esquema 6. Compuestos antagonistas de receptores de estrógenos. En el esquema se muestran tres compuestos utilizados en clínica para tratar algunos tipos de tumores y que se han clasificado como antagonistas “no-puros” (tamoxifeno, raloxifeno) y “puros” como ICI 182,780. Todos ellos comparten el grupo hidroxilo en el primer anillo fenólico, característica esencial para su interacción con el sitio de unión a ligando en los receptores de estrógenos α y β , si bien interaccionan y actúan como agonistas con el nuevo receptor GPR-30.

Entre los antagonistas inicialmente desarrollados se encuentra el compuesto tamoxifeno que ha sido utilizado en clínica para el tratamiento de carcinoma de mama (Katzenellenbogen and Frasor 2004).

Sin embargo, en función del tipo celular, el tamoxifeno y sus derivados pueden llegar a desencadenar eventos celulares en lugar de bloquear la señalización, pudiendo inducir la expresión de genes que influyen en el desarrollo del tumor. Por esa razón se desarrollaron otros compuestos que por ausencia de este tipo de efectos potenciadores de la tumorigénesis se denominaron antagonistas “puros”, entre los que se encuentra el compuesto ICI 182,780 (Howell et al. 2000). Cada uno de estos antagonistas modula el patrón génico de manera específica (Frasor et al. 2004). (**Esquema 6**).

En algunos casos, la administración del antagonista ICI induce en ciertos tipos celulares la degradación del receptor (Dauvois et al. 1993; Wijayaratne and McDonnell 2001). Sin embargo, se ha detectado recientemente que parte de la señalización desencadenada por ICI está mediada por un nuevo receptor de estrógenos identificado (ver apartado 4.2). Se ha comprobado en un estudio reciente que con la administración sistémica de este compuesto antagonista, el ICI atraviesa la barrera hematoencefálica pudiendo ejercer sus efectos sobre el cerebro (Alfinito et al. 2008). Para mayor complejidad, como se verá en el apartado 4.1.2., existen formas del receptor de estrógenos que no poseen dominio de unión a ligando y que por tanto no se verían afectados por la presencia del antagonista.

3. Función de los Estrógenos en cerebro.

3.1. Efecto de los estrógenos en el desarrollo neuronal.

Durante el desarrollo embrionario tiene lugar la expresión de los receptores de estrógenos coincidiendo con el momento de la formación del tubo neural (Zhang et al. 2008). El receptor de estrógenos β (ER β) se ha asociado también con procesos de guía neuronal en la generación de las diferentes capas que conforman la corteza cerebral (Wang et al. 2003a).

Por otra parte, los estrógenos parecen favorecer una mayor plasticidad en la morfología neuronal que tiene lugar a diferentes niveles estructurales, como la elongación de las neuritas en el desarrollo de neuronas dopaminérgicas y de la línea celular PC12 (Topalli and Etgen 2004), neuroblastoma SK-N-BE o *in vivo* (Murphy and Segal 1996) o la remodelación (Pozzo-Miller et al. 1999) y aumento en la densidad de espinas dendríticas en neuronas de hipocampo adultas (Gould et al. 1990; Li et al. 2004; McEwen et al. 1999; Woolley and McEwen 1993).

3.2. Efecto de los estrógenos en neuronas maduras: efectos en la excitabilidad de la membrana.

Los estrógenos son capaces de alterar la excitabilidad intrínseca de las neuronas en una amplia variedad de regiones cerebrales, que incluyen hipotálamo, área preóptica, amígdala, estriado, cerebelo e hipocampo. Este efecto ha sido estudiado fundamentalmente en hipotálamo e hipocampo encontrando diversas acciones, revisado en (Kelly and Ronnekleiv 2009). El estradiol es capaz de

modular las corrientes de potasio que controlan el potencial de membrana en neuronas hipotalámicas por señalización iniciada desde la membrana plasmática (Qiu et al. 2003; Qiu et al. 2006).

Otro de los ejemplos de la señalización de estradiol en relación a la actividad neuronal se da en la región de hipocampo CA1. En las neuronas piramidales de CA1 el estradiol aumenta su excitabilidad potenciando las corrientes inducidas por kainato (Gu and Moss 1996) en lo que parece ser un efecto promovido por un receptor de estrógenos asociado a la membrana plasmática. Se ha descrito también su capacidad de regular canales de calcio de tipo L y la regulación positiva y negativa de la fosforilación de la proteína CREB (Boulware et al. 2005) en cultivos neuronales.

Estos efectos ocurren en plazos muy cortos de tiempo lo que resultó ser bastante sorprendente ya que parecía un efecto independiente de nueva síntesis de proteínas.

3.3. Papel de los estrógenos en funciones cognitivas. Relación de los niveles de estrógenos con la capacidad de aprendizaje y memoria.

Es bien conocido el efecto positivo de los estrógenos en varias funciones cerebrales como su relación con una mayor facilidad en tareas de aprendizaje y aumento de la memoria a largo plazo así como sus efectos en comportamiento, inicialmente descritos clínicamente en el descenso hormonal que ocurre durante la menopausia (Fink et al. 1996; Sherwin 1988).

Dado que los estrógenos presentan una concentración en plasma muy variable a lo largo de la vida, existen numerosos estudios de la implicación de la concentración de estradiol a lo largo del ciclo menstrual en tareas de aprendizaje. Así, se ha hallado una relación en ratones entre su periodo de *pro-estrus*, cuando los niveles de estrógenos alcanzan su punto máximo en plasma, con una mayor capacidad de resolución de tareas que dependen del hipocampo, como el ensayo del laberinto de agua diseñado por Morris (Packard et al. 1996).

En el proceso de memorización es importante la plasticidad neuronal que permite establecer contactos sinápticos. En las neuronas maduras se desarrollan las estructuras denominadas espinas dendríticas a las que se les atribuye tras numerosos estudios una importante implicación en procesos de aprendizaje y memoria, revisado en (Leuner and Shors 2004). Existen numerosos trabajos que determinan variaciones en la densidad de espinas dendríticas tras la exposición a estradiol en cultivos neuronales o diferencias en el número de espinas dendríticas en neuronas de hipocampo en función de la concentración de estrógenos determinado por el ciclo menstrual en ratas hembra (Woolley and McEwen 1992).

La pérdida brusca de estrógenos durante la menopausia da lugar a un cambio tanto en comportamiento como en capacidad de memoria en algunas mujeres (Carlson and Sherwin 1998). En algunos casos, aunque es motivo de controversia, el tratamiento hormonal sustitutivo, consistente en aportación de compuestos estrogénicos naturales y no naturales, consigue paliar estos síntomas (Phillips and Sherwin 1992). Parece claro tras numerosos estudios que el tiempo que transcurre desde el descenso

hormonal hasta el inicio de la terapia de reemplazamiento es un factor limitante para la eficacia de ésta (Resnick et al. 1997).

Es interesante no olvidar en todos estos estudios en relación al ciclo menstrual, la síntesis local de estrógenos en cerebro con el fin de comparar las concentraciones de estrógenos de las que se parte en cada caso.

3.4. Neuroprotección por estrógenos.

El tratamiento hormonal, no sólo ha tenido la finalidad de paliar los síntomas pre y post-menopáusicos sino también la sintomatología clínica asociada a enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer que sigue en estudio desde que se iniciaron estos ensayos en los años 80 (Fillit et al. 1986). La razón de esta aplicación se debe a los estudios epidemiológicos en los que aunque bajo controversia, se relaciona una mayor incidencia en la enfermedad de Alzheimer en mujeres post-menopáusicas como resultado de la disminución de estrógenos circulantes (Manly et al. 2000). Los resultados obtenidos con el tratamiento hormonal sustitutivo en cuanto a la capacidad de memoria en estos pacientes son muy variables (Mulnard et al. 2000; Wolf et al. 2005), posiblemente debido a que la aparición de los síntomas sucede bastante tiempo después de la aparición de la enfermedad y por tanto, en el momento del tratamiento farmacológico el grado de afectación del cerebro es elevado. Sin embargo, en muchos casos se consigue reducir notablemente el riesgo del padecimiento de la enfermedad con la terapia hormonal iniciada de manera temprana (Birge and Mortel 1997; Yaffe et al. 1998). Uno de los mecanismos propuestos por los que el estradiol facilitaría la supervivencia neuronal es mediante el control de la acumulación de placas de β -amiloide, uno de los rasgos identificativos de esta patología y que conlleva la muerte neuronal. Este control parece llevarse a cabo tanto desde su actuación en las neuronas directamente (Xu et al. 1998), con la activación de Akt como uno de los mecanismos de protección (Zhang et al. 2001), como a través de la mediación de la glía (Li et al. 2000).

No sólo la enfermedad de Alzheimer ha sido objeto del estudio de la relación de la progresión de la enfermedad con los niveles de estrógenos, sino que también en otras enfermedades como el parkinson (D'Astous et al. 2004), epilepsia (Veliskova et al. 2000), esclerosis múltiple (Offner and Polanczyk 2006) u otro tipo de afectaciones del comportamiento como trastorno bipolar (Freeman et al. 2002; Huber et al. 2001), o esquizofrenia (Fink et al. 1996) se ha sugerido una relación directa del grado de la sintomatología y los niveles de estrógenos. Se ha identificado también un papel de los estrógenos en la mediación de la respuesta inflamatoria (Vegeto et al. 2003) que tiene lugar en muchas de las enfermedades citadas y que se correlaciona con la pérdida neuronal (Gonzalez-Scarano and Baltuch 1999; Kalaria 1999).

En la patología de Alzheimer resulta estar alterada la expresión de receptores de estrógenos en las áreas cerebrales afectadas por la enfermedad (Hestiantoro and Swaab 2004; Ishunina and Swaab 2009; Savaskan et al. 2001). Lo cual podría explicar que el efecto protector sea menor en muchos casos del

esperado por los resultados positivos provenientes del análisis de modelos animales análogos. Una posible explicación a los resultados clínicos observados en todos estos casos citados para el efecto neuroprotector que ejercen los estrógenos podría ser que en los modelos animales no exista una regulación de los niveles de expresión de los receptores de estrógenos tan importante como la que existe en humanos.

En todas las enfermedades neurodegenerativas, entre ellas Alzheimer, Huntington, Parkinson, y esclerosis múltiple, tiene lugar una muerte neuronal que ocurre en muchos casos por apoptosis aunque hay procesos de autofagia descritos. A día de hoy no tenemos datos concluyentes de si la neuroprotección mediada por estrógenos es sólo debida a modulación de apoptosis, de autofagia o de ambos sistemas de muerte.

Existen numerosos estudios que apoyan la idea del efecto beneficioso de la síntesis local de estrógenos en las áreas afectadas para el curso de la enfermedad. Además, se ha comprobado cómo la falta de la enzima aromatasa en el cerebro induce la aparición local de neurodegeneración (Azcoitia et al. 2001). Estos datos ayudan a entender cuál es la función de los esteroides sintetizados en regiones cerebrales concretas (Clark et al. 2001).

El efecto neuroprotector del estradiol en el Sistema Nervioso Central se consigue en parte por su naturaleza de potente antioxidante (Behl et al. 2000; Green et al. 2000), que posee de manera intrínseca por tratarse de un compuesto fenólico, pero la gran diversidad de respuestas que promueve parece deberse a mecanismos moleculares dependientes de la unión de estradiol con sus receptores. De esta manera modula la transcripción y se estimula la expresión de proteínas que favorecen la supervivencia neuronal, por ejemplo las proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 frente a isquemia (Dubal et al. 1999; Nilsen and Diaz Brinton 2003) o Bcl-Xl (Patrone et al. 1999; Pike 1999).

Los mecanismos moleculares por los que se obtiene el efecto neuroprotector mediado por estrógenos (estradiol) siguen siendo objeto de numerosos estudios, dada la diversidad de compuestos tóxicos frente a los que estradiol muestra un efecto positivo (Green and Simpkins 2000).

4. Receptores de estrógenos.

Como se ha mencionado anteriormente, en términos genéricos se considera que el estradiol puede tener dos tipos de funciones unas mediadas por receptor y otras más inespecíficas, asociadas a sus acciones antioxidantes. Se describirán a continuación las diferentes formas de receptores de estrógenos: ER α , ER β (*Estrogen receptor*) y GPR-30 (*G-Protein coupled Receptor 30*) de las que se describirá su estructura básica y funciones descritas fundamentalmente en neuronas.

4.1. ER α , y ER β .

Existen 2 isoformas de receptor de estrógenos, ER, en mamíferos, ER α de 67 KDa (White et al. 1987) y ER β de 58 KDa (Kuiper et al. 1996); (Fitzpatrick et al. 1999) codificadas por genes diferentes

(**Esquema 7**) y cuya función parece complementaria aunque no redundante. Su afinidad por estradiol es similar: K_d ER α : 0.1 nM, K_d ER β : 0.4 nM (Paech et al. 1997).

Homo sapiens	Cromosoma	Localización	GeneID
ESR-1 , NR3A1 (ER α)	6	6q25.1	2099
ESR-2 , NR3A2 (ER β)	14	14q23.2	2100

Mus musculus	Cromosoma	Localización	GeneID
Esr-1 (ER α)	10	10 12.0 cM	13982
Esr-2 (ER β)	12	12 33.0 cM	13983

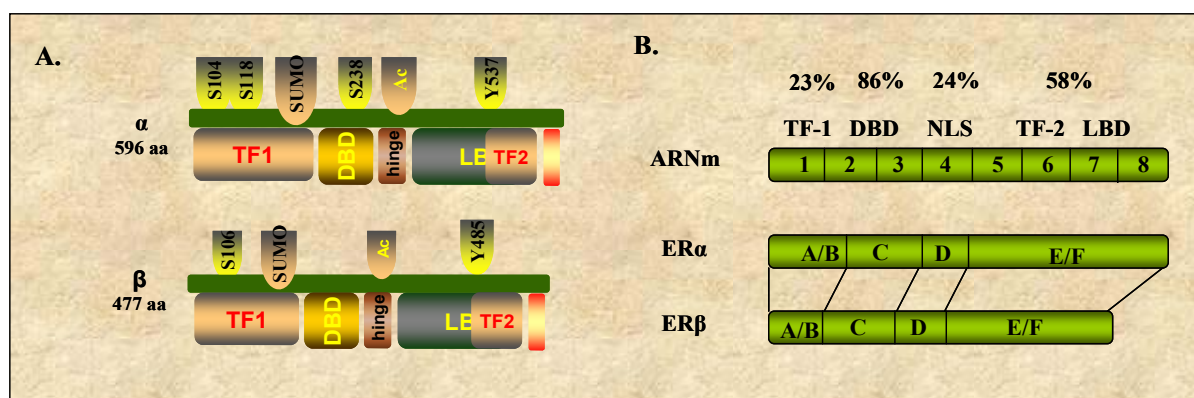
Esquema 7. Nomenclatura y localización cromosómica de ER α y ER β . En la tabla se indica la localización en dos cromosomas diferentes de las isoformas α y β con su nomenclatura en el banco de datos GeneID tanto de humano como de ratón.

Los receptores de estrógenos (ERs) pertenecen a la superfamilia de receptores nucleares (Beato and Klug 2000; Evans 1988), y aunque han sido clasificados históricamente como activadores de la transcripción en respuesta a la llegada de su ligando, se están describiendo continuamente nuevas funciones de éstos asociadas a la señalización rápida de los receptores, es decir, a la activación de rutas intracelulares de una manera independiente de expresión génica. La variedad de las respuestas que son capaces de inducir depende además del tipo de tejido.

4.1.1. Dominios de los receptores de estrógenos.

4.1.1.a Dominio central (C): dominio de unión a DNA.

Entre las isoformas α y β existe una alta homología principalmente en el dominio de unión a ADN (86%)(Kuiper et al. 1997), estructuras en dedos de Zn^{2+} que reconocen en el genoma secuencias específicas denominadas ERE (elementos de respuesta a estrógenos) consistentes en 2 regiones palindrómicas 5'-PuGGTCA-3' separadas entre sí por 3 pares de bases (Greene et al. 1986). La unión a estas secuencias tiene lugar en forma de dímeros del receptor, la asociación de cada monómero del receptor a la secuencia de ADN es cooperativa (Anolik et al. 1995; Klinge et al. 1992a; Klinge et al. 1992b).



Esquema 8. A) Estructura de los dominios de ERα y ERβ. En el esquema se representan los dominios de ambas isoformas: AF-1 (A/B), dominio de unión a ADN (DBD) también denominado C, secuencia de localización nuclear (Hinge o D), dominio de unión a ligando (LBD) y algunas de las modificaciones post-traduccionales que modifican la función de los mismos (ver apartado 4.6) y AF-2, estos últimos denominados E/F. **B) Correspondencia entre los exones del ARNm y los dominios de la proteína.** El % expresado en la parte superior del esquema muestra la homología de la secuencia de cada dominio entre ambas isoformas de ER. Los dominios están expresados según la nomenclatura A-F (Krust et al. 1986) y junto a ellos se esquematiza la correlación de cada exón con cada dominio.

4.1.1.b. Dominio E, situado en el extremo C-terminal, dominio de unión a ligando.

El dominio de unión a ligando tiene una homología del 56% entre ambas isoformas y está constituido por las hélices α 5 y 6 que conforman un sitio hidrofóbico en el que se sitúa el anillo fenólico orientando de una manera determinada el grupo hidroxilo de la molécula de estradiol. Dicho grupo hidroxilo es compartido también por el resto de compuestos estrogénicos presentes en el organismo en menor cantidad (estrona, estriol) y también lo poseen los antagonistas sintetizados como el ICI 162,780 o el tamoxifeno. La interacción del ligando natural con el receptor da lugar a un cambio conformacional en éste de manera que queda expuesta la región de dimerización, presente en esta misma región de la secuencia del receptor (Brzozowski et al. 1997; Pike et al. 1999).

4.1.1.c. Dominios A/B (AF-1), situado en el extremo N-terminal y F (AF-2), en el extremo C-terminal, denominados dominios de transactivación.

Dominio AF-1.

Las isoformas del receptor de estrógenos α y β difieren de una manera notoria en la secuencia del extremo N-terminal, es decir, principalmente en el dominio de transactivación-1. La comparación de las secuencias de ERα y ERβ en esta región muestra tan sólo un 23% de homología entre ambas (Kuiper et al. 1997). Este hecho se debe en parte a la diferencia de longitud del mismo, lo que les confiere distinta conformación estructural. Éste puede ser un factor determinante en las diferencias que existen entre ambas isoformas en cuanto a la especificidad de unión de distintos ligandos y a su afinidad. En esta región existen numerosos residuos susceptibles de ser fosforilados por diferentes proteínas quinasas presentes en el citoplasma celular (ver apartado 4.6.1). Estas modificaciones post-traduccionales confieren características específicas para cada isoforma en respuesta a la llegada del ligando.

Dominio AF-2.

Tras la unión del ligando, los dos tipos de receptores orientan la hélice 12 de manera que se crea un surco hidrofóbico que resulta idóneo para la unión de coactivadores a través del motivo LXXLL (NR box), como es el caso por ejemplo de la familia de coactivadores de receptor de esteroides (SRC) (Montano et al. 1995). Las diferencias en la secuencia entre α y β en esta región sugieren diferentes afinidades y especificidad de unión a varios ligandos.

4.1.2. Variantes de ARNm de ERs: Formas de *splicing* alternativo.

La secuencia genómica de ER α se encuentra codificada en un total de 8 exones, con la particularidad de presentar en el extremo 5' de dicha secuencia múltiples promotores aumentando así, junto con la posibilidad de diferentes formas alternativas de procesamiento del ARN mensajero ("*splicing*"), la diversidad de formas finales de ARNm de receptores de estrógenos. En relación a las variantes de ARN mensajero, existen numerosos estudios en los que se han observado diferentes formas de *splicing* tanto en tejidos cancerosos como normales aunque no siempre son traducidos a proteína.

A. Formas de *splicing* de ER α .**a) Deleción del exón 1.**

Una de ellas es la forma de ER α de 46 KDa descrita en MCF-7 (línea celular derivada de cáncer de pulmón humano) (Flouriot et al. 2000), osteoblastos (Denger et al. 2001), células endoteliales (Li et al. 2003) o en cardiomiocitos (Roperio et al. 2006). Esta variante se presenta asociada a la membrana plasmática o bien a estructuras ricas en actina. Esta forma de 46 KDa carece del dominio AF-1 (es decir, de los primeros 173 aminoácidos) y se genera mediante la eliminación durante la transcripción del exón 1. Esta forma de receptor no posee capacidad de activar la transcripción génica pero sí es capaz de modular dicha función cuando se asocia con ER α -66 KDa (forma completa del receptor).

b) Deleción de exones 2 y 6.

Como resultado de un procesamiento diferente del ARNm, se obtiene también una forma de ER α de 36 KDa presente tanto en células derivadas de cáncer de pulmón-ER α -66 KDa positivas (MCF-7, T47D, H3396) como en células del mismo origen pero carentes de ER α -66 KDa (MDA-MB 231, MDA-MB 436)(Wang et al. 2005) (Wang et al. 2006). En estos trabajos se sugiere la posibilidad de que esta forma se genere tras la supresión de la transcripción de los exones 2 y 6 de la forma completa del receptor de estrógenos, y en consecuencia no contiene los dominios AF-1 y AF-2.

c) Otras deleciones: exón 4, exón 5, exón 7.

Se ha descrito la presencia de productos resultantes de la deleción de otros exones en tumores primarios de ovario (deleción del exón 4, ER $\alpha\Delta$ 4), en líneas celulares derivadas de tumores primarios procedentes de tejido pulmonar (deleción del exón 7, ER $\alpha\Delta$ 7) o en tejido primario endometrial y de pulmón (deleción del exón 5, ER $\alpha\Delta$ 5) (Chappell et al. 2000). La diferente composición de exones

resulta en conformaciones de la proteína bastante diversas, puesto que por ejemplo la eliminación del exón 5 conlleva la ausencia de dominio de unión a ligando, haciendo que en función del tipo celular en el que se exprese esta forma se vea disminuída también la capacidad de respuesta de ER α -66 KDa.

Recientemente, se han descrito formas de ER α variantes de *splicing* por delección en los exones 2, 4 y 7, que se distribuyen de forma específica en diferentes áreas del cerebro (Ishunina and Swaab 2008; Ishunina and Swaab 2009; Schupf et al. 2008). En estos trabajos se relaciona la cantidad relativa de las variantes del receptor de estrógenos con un posible incremento en la incidencia de la enfermedad de Alzheimer y la susceptibilidad al tratamiento con estrógenos en estos pacientes.

Es importante destacar que cada una de estas variantes de ER α es capaz de formar heterodímeros con la forma original del receptor pudiendo modular la función de éste (Wang et al. 1999).

B. Formas de “splicing” de ER β .

También en el caso de ER β se han descrito diferentes formas de splicing, como resultado de la eliminación de determinadas secuencias del exón 8 (Moore et al. 1998) denominadas ER- β 2 y ER- β 3 que dan lugar a proteínas de 56 KDa.

Además, se han identificado otras formas truncadas sin función en transcripción que contienen sólo parte del exón 7 y diferentes secuencias del exón 8 denominadas ER β 4 y ER β 5 de los que se obtienen proteínas de 54 y 53KDa respectivamente (Scobie et al. 2002). Como consecuencia de las diferencias de su extremo C-terminal (AF-2), estas variantes de ER β difieren en su afinidad de unión a estradiol, siendo la afinidad de las formas 4 y 5 moderada mientras que la variante de “*splicing*” ER β 2 carece de capacidad de unión de estradiol. Cada una de estas formas puede formar un heterodímero con ER β y modificar el patrón de reclutamiento de coactivadores en el ADN.

4.2. Receptor GPR30.

Se ha identificado en los últimos años un receptor con alta afinidad por estrógenos (Filardo and Thomas 2005; Thomas et al. 2005) y cuya secuencia difiere totalmente de las dos isoformas clásicas de ER. Este receptor se denomina GPR-30 y fue identificado inicialmente como miembro de los receptores huérfanos de siete dominios transmembrana (Carmeci et al. 1997)(Owman et al 1996). La homología de su secuencia se acerca a la subfamilia de quimioquinas de GPCRs (*G-protein coupled Receptors*) aunque la mayor coincidencia en secuencia la comparte con los receptores de IL-8 en sólo un 30% (Owman et al 1998).

Su expresión en diferentes tipos celulares presenta una correlación con la expresión de los receptores de estrógenos α/β (Carmeci et al. 1997). La localización que presenta es fundamentalmente en membranas del retículo endoplásmico, como se ha visto utilizando la línea celular HEK 293 (Revankar et al. 2005) y neuronas piramidales (Matsuda et al. 2008) aunque hay datos que indican expresión de GPR-30 en la membrana plasmática de neuronas de hipocampo (Funakoshi et al. 2006).

En el **esquema 9** se resumen algunos datos de la señalización mediada por GPR-30 obtenidos en linaje tumoral.

4.3. Expresión de los receptores de estrógenos en cerebro.

La distribución de ambas isoformas, ER α y ER β , es muy amplia. En cerebro los receptores de estrógenos se encuentran en un gran número de áreas (Shughrue et al. 1997). Además de ser abundantes en hipotálamo, en donde regulan la liberación de hormonas principalmente relacionadas con funciones reproductoras, su expresión es elevada en cerebelo, hipocampo o corteza (Gonzalez et al. 2007).

El receptor GPR-30 ha adquirido últimamente importancia también en el análisis de las funciones estrogénicas en el cerebro puesto que se expresa en hipocampo y en diferentes regiones cerebrales (Brailoiu et al. 2007) Funakoshi T et al 2006, (Sakamoto et al. 2007) y su activación determina la modulación de la actividad nociceptiva y del hipotálamo (Qiu et al. 2006).

La expresión de ER α y ER β se mantiene en el adulto aunque se han descrito variaciones en los niveles relativos de ambas isoformas en función del momento del desarrollo y de la región del SNC. En el hipocampo adulto de muestras humanas parece ser más abundante ER β que ER α (Osterlund et al. 2000) También la expresión de GPR-30 ha sido descrita en neuronas adultas de ratón en cultivo e “*in vivo*” en algunas subpoblaciones de neuronas corticales y en el giro dentado (Isensee et al. 2009) y en varias regiones del cerebro de rata adulta, entre ellas en el hipocampo (Brailoiu et al. 2007).

4.4. Localización de los receptores de estrógenos.

4.4.1. Citoplasma/Núcleo.

En el modelo clásico de receptores nucleares, es decir, en la activación de su vía genómica, los receptores de estrógenos son proteínas que residen en el citoplasma estabilizadas allí por su unión con proteínas HSPs (*Heat shock protein*) (ver apartado 5.1) y que tras la interacción con el ligando se movilizan al núcleo. Sin embargo, la translocación al núcleo de los receptores tras la adición de estradiol no es tan evidente en todos los tipos celulares por la variabilidad de su localización.

4.4.2. Mitocondria.

Se ha descrito la presencia de ERs en mitocondrias en varios tipos celulares en los que varía la isoforma presente en este compartimento. Así, se ha analizado la presencia de ER α y ER β en el interior de la matriz mitocondrial en la línea celular derivada de pulmón MCF-7 (Chen et al. 2004) pero son más abundantes los datos relacionados con la presencia de ER β en mitocondria en neuronas de corteza e hipocampo (Yang et al. 2004), cardiomicitos o endotelio aunque estos resultados se discutieron posteriormente originando cierto debate al respecto (Schwend and Gustafsson 2006).

Las funciones de los receptores de estrógenos relacionadas con la actividad mitocondrial podrían ocurrir a varios niveles, por un lado desde su acción nuclear y por otro desde su localización mitocondrial.

La presencia de estradiol da lugar a la modulación de la capacidad mitocondrial y a la reducción de formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en el cerebro (Razmara et al. 2007), entre otros eventos como la activación de varios genes nucleares con elementos de respuesta a ERs que codifican para varios de los componentes de la cadena respiratoria mitocondrial (citocromo c, subunidad IV del complejo IV, manganeso-peróxido dismutasa) en células endoteliales (Stirone et al. 2005).

4.4.3. Espinas dendríticas, densidades post-sinápticas.

En neuronas primarias procedentes de hipocampo o corteza puede detectarse la presencia de ERs en las espinas dendríticas (Milner et al. 2005), a nivel de la densidad postsináptica o ER β asociado a las membranas sinápticas en el hipocampo (Nishio et al. 2004). La localización del receptor de estrógenos en los sitios en los que tiene lugar la respuesta a la señal de activación neuronal sugiere un sistema muy preciso en cuanto a la respuesta producida. Se ha determinado que el estradiol modula la síntesis local de proteínas de la densidad postsináptica así como cambios en el número y morfología de las espinas dendríticas en hipocampo.

4.4.4. Membrana plasmática.

El primer trabajo que sugería la presencia de un receptor de estrógenos en la membrana plasmática se remonta a 1977 (Pietras and Szego 1977). En él se describían sitios específicos de unión a estrógenos en la superficie externa de células endometriales. Aunque existen numerosos trabajos que describen la posibilidad de la existencia de receptores de estrógenos asociados a la membrana plasmática existe cierta controversia respecto a este tema en varios puntos. Esta debe fundamentalmente a la ausencia en las secuencias de las proteínas ER α /ER β de regiones ricas en residuos básicos, dominios de anclaje a membrana, sitios de anclaje glucosilfosfatidilinositol (GPI) o dominios PDZ que facilitarían su localización en membrana plasmática.

Forma de localización de ER en membrana.

En primer lugar, existen trabajos que describen esta asociación en términos de unión de ERs a proteínas de membrana (Longo et al. 2004; Song et al. 2004) en los que se muestra asociación de ER α con receptores de membrana o proteínas adaptadoras citoplasmáticas como Shc o Src en osteoblastos y en líneas tumorales. Sin embargo, otros autores describen la localización de algunas variantes del receptor comentadas en el apartado anterior, ER α -46KDa o ER α 36-KDa, en la misma membrana plasmática. En concreto se explica esta localización con una modificación post-traducciona l de la proteína ER α -46KDa por palmitoilación (Razandi et al. 2003).

Naturaleza del receptor asociado a membrana.

Un interesante punto a debatir es la naturaleza del receptor de estrógenos asociado a la membrana. Existen trabajos que muestran la posibilidad de la existencia de un receptor diferente, al que se le ha denominado ER-X (62-63 KDa). En estos trabajos se postula la presencia de una proteína originada en un gen diferente a ER α y ER β pero que parece tener elevado grado de similitud con ER α puesto que comparte el epítipo de uno de los anticuerpos anti-ER α , y que se ha localizado en membrana plasmática en el neocórtex (Toran-Allerand et al. 2002) en ratones KO para ER α .

Otros atribuyen la capacidad de respuesta rápida a estrógenos observada en hipocampo y endometrio, entre otros tejidos, a su interacción con receptores de estrógenos no-clásicos (no- α , no- β) que se ha identificado como una proteína de siete dominios transmembrana acoplada a proteínas heterotriméricas G (GPR-30). En algunos trabajos se le atribuye localización en la membrana de retículo endoplásmico de varios tipos celulares (Revankar et al. 2005) mientras que en otros se describe su integración en la membrana plasmática de neuronas de hipocampo (Funakoshi et al. 2006). Por otro lado, la naturaleza del receptor de estrógenos presente en la membrana plasmática (denominado frecuentemente m-ER) responsable de la activación de proteínas Gq heterotriméricas en neuronas hipotalámicas sigue bajo controversia como indican algunos estudios realizados en ratones *knock-out* para GPR-30 en los que se sigue observando dicha activación y postulando que se trataría de un receptor no-ER α , no-ER β y no GPR-30 (Qiu et al. 2008).

4.5. Modificaciones post-traduccionales de los receptores de estrógenos.

Aunque no ha sido objeto de estudio en este trabajo este tipo de regulación de los ERs, es interesante apuntar que en determinadas circunstancias, por activación de rutas citoplasmáticas tras una señal extracelular o en respuesta a la llegada de estradiol los ERs, aunque principalmente se ha analizado en mayor medida ER α , pueden sufrir modificaciones post-traduccionales, de ellas la fosforilación ha sido la mas abundantemente estudiada. Existen varios residuos de serina en la secuencia de ER α (y más concretamente en la región AF-1, extremo N-terminal A/B) que pueden ser fosforilados por diferentes quinasas intracelulares ciclinaA/cdk2 (Rogatsky et al. 1999), TFIIH/Cdk (Chen et al. 2000), de MAP quinasa (MAPK, *mitogen-activated protein kinase*) (Kato et al. 1995) y más recientemente se detectó la capacidad de la enzima glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK3) para fosforilar ER α -Ser¹¹⁸ en células derivadas de la línea MCF-7 (células MELN) (Medunjanin et al. 2005). Otros sitios potenciales de fosforilación de ER α , en este caso por la proteína PKA, son los residuos Ser²³⁶, Ser³⁰⁵, Ser³³⁸ y Ser⁵¹⁸. Entre ellos, el residuo de Ser²³⁶ está bien caracterizado como uno de los sitios reguladores de dimerización y de unión a ADN (Clark et al. 2001; Chen et al. 1999; Tharakan et al. 2008).

Existen otros datos, también interesantes, sobre otras modificaciones como la palmitoilación, S-palmitoilación del residuo de Cys⁴⁴⁷ de ER α que ha sido estudiado en células tumorales HeLa (Acconcia et al. 2005; Acconcia et al. 2004; Marino et al. 2006), metilación de ER α en el residuo de Arg²⁶⁰ de manera transitoria en células derivadas de mama, MCF-7, HeLa y en fibroblastos, NIH3T3 (Le Romancer et al. 2008), acetilación por la proteína p300 preferentemente en los residuos Lys³⁰² y Lys³⁰³ (Kim et al. 2006; Wang et al. 2001) y su procesamiento proteolítico.

4.5.5. Procesamiento proteolítico por ubiquitilación.

Una de las modificaciones postraduccionales más interesantes y de gran controversia, de los receptores de estrógenos es la fragmentación proteolítica.

En diversos trabajos se expone la inducción de la degradación parcial o total de ER α con la llegada del ligando. La unión de componentes del proteosoma a ER α no sólo tiene lugar como mecanismo de

control de la cantidad de receptor presente en la célula sino como mecanismo de control de la expresión génica. (Reid et al. 2003).

La degradación de ER α por proteosoma parece ocurrir en algunos tipos celulares tanto tras su asociación a su ligando natural como también con la adición del compuesto antiestrogénico ICI 182,780, este compuesto disminuye el contenido celular de ER α acelerando el recambio de la proteína y su adición resulta también en la inmovilización de ER α en el interior del núcleo. (Dauvois et al. 1992; Stenoien et al. 2001; Wijayaratne and McDonnell 2001)

De nuevo, no todos los tipos celulares muestran este comportamiento, así en neuronas no se ha determinado la degradación del receptor como parte del ciclo de transcripción ni la degradación del mismo mediante la adición de ICI 182, 780.

4.6. Sistemas para el estudio de los receptores de estrógenos.

4.6.1. Modulación de la actividad de ERs (agonistas, antagonistas) y de los niveles de proteína (sobreexpresión y uso de ARN de interferencia).

El desarrollo de agonistas específicos para cada una de las isoformas de ER α (PPT) (Stauffer et al. 2000), ER β (DPN) (Meyers et al. 2001) y del nuevo receptor GPR-30 (G1) (Bologa et al. 2006) supone una herramienta de gran utilidad para diferenciar las funciones de cada uno de ellos. Combinados con el uso de los antagonistas de ERs (Howell et al. 2000; Katzenellenbogen and Frasor 2004) permiten describir en detalle la implicación de éstos en las rutas de señalización modificadas por estrógenos.

Alternativamente, el uso de plásmidos de expresión de diferentes versiones de ERs modificados es otra de las aproximaciones de mayor aplicación. La expresión de formas mutantes de los ERs en los que se suprime la función de alguno de sus dominios (Dauvois et al. 1993) mediante delecciones o mutaciones (Cavaillès et al. 1995; Danielian et al. 1993; Henttu et al. 1997; Valentine et al. 2000) (Bjornstrom and Sjoberg 2002) proporcionan información de la implicación de cada uno de ellos en las diferentes funciones. Sin embargo, debido a la diferencia de secuencia y características de GPR-30 no existen todavía datos de este tipo para este receptor.

Más recientemente, con el desarrollo de la técnica de ARN de interferencia como mecanismo de silenciamiento génico se ha estudiado el efecto de la supresión de manera específica de cada isoforma de ERs. Existen diferentes construcciones para cada isoforma, también para el nuevo receptor GPR-30, que han sido testadas en diferentes experimentos.

4.6.2. Líneas celulares deficientes en la expresión de ERs.

Existen varios tipos celulares que de forma natural no expresan o bien alguna isoforma de ERs (la línea BT20, ER α negativa) o bien ni ER α ni ER β (las líneas COS-7, MDA-MB-231 (Cailleau et al. 1974), MDA-MB-468, o SkBr) por lo que son utilizadas como controles negativos de la señalización si bien es importante tener en cuenta su origen tumoral en todos los casos. Además, en algunos tipos

celulares negativos para ER α y ER β se encuentran algunas de las variantes de *splicing* alternativo descritas anteriormente o la expresión de GPR-30.

4.6.3. Ratones deficientes en ERs (*Knock-outs*)

Para analizar las diferentes isoformas de los receptores de estrógenos se han generado varias colonias de ratones carentes o bien de ER α (α ERKO), de ER β (β ERKO) o de ambas isoformas ($\alpha\beta$ ERKO) con el fin de esclarecer las isoformas y variantes implicadas en la señalización rápida mediada por estradiol o en la modulación de la actividad genómica de los receptores de estrógenos. Los ratones *knockout* sencillos presentan diferentes fenotipos, al menos en cuanto a su efecto en los órganos reproductores, dejando clara la diferencia en las funciones de ambos tipos α y β . Mientras que los ratones α ERKO presentan órganos reproductores atrofiados e infertilidad, los β ERKO no muestran ese fenotipo, hecho en el que muchos autores se apoyan para atribuir a la isoforma β mayor implicación que ER α en las funciones en tejidos no relacionados con reproducción de los receptores (Dupont et al. 2000). Otra de las características diferenciales entre ambos *knockouts* es su capacidad de respuesta a la presencia de insulina. Mientras que el ratón β ERKO tiene una cantidad de tejido adiposo normal, el ratón α ERKO presenta obesidad y alta resistencia a insulina detectándose bajos niveles de transporte de glucosa al interior celular. Este fenotipo se debe a que los estrógenos en concentraciones normales son capaces de promover la entrada de glucosa a las células en presencia de insulina y esta función se realiza a través de su interacción con ER α .

En cuanto a estudios realizados utilizando ratones deficientes en receptores de estrógenos en neuronas, se ha determinado por ejemplo que la señalización en neuronas hipotálamicas y la regulación de la entrada de potasio por estradiol es un efecto independiente de ER α o de ER β (Qiu et al. 2006). Se han realizado también algunas pruebas de comportamiento en los ratones deficientes de ER α o de ER β obteniéndose resultados diversos apuntando a ER α (Fugger et al. 2000) o ER β (Liu et al. 2008) en función del test de comportamiento y los parámetros estudiados en tareas de aprendizaje dependientes del hipocampo.

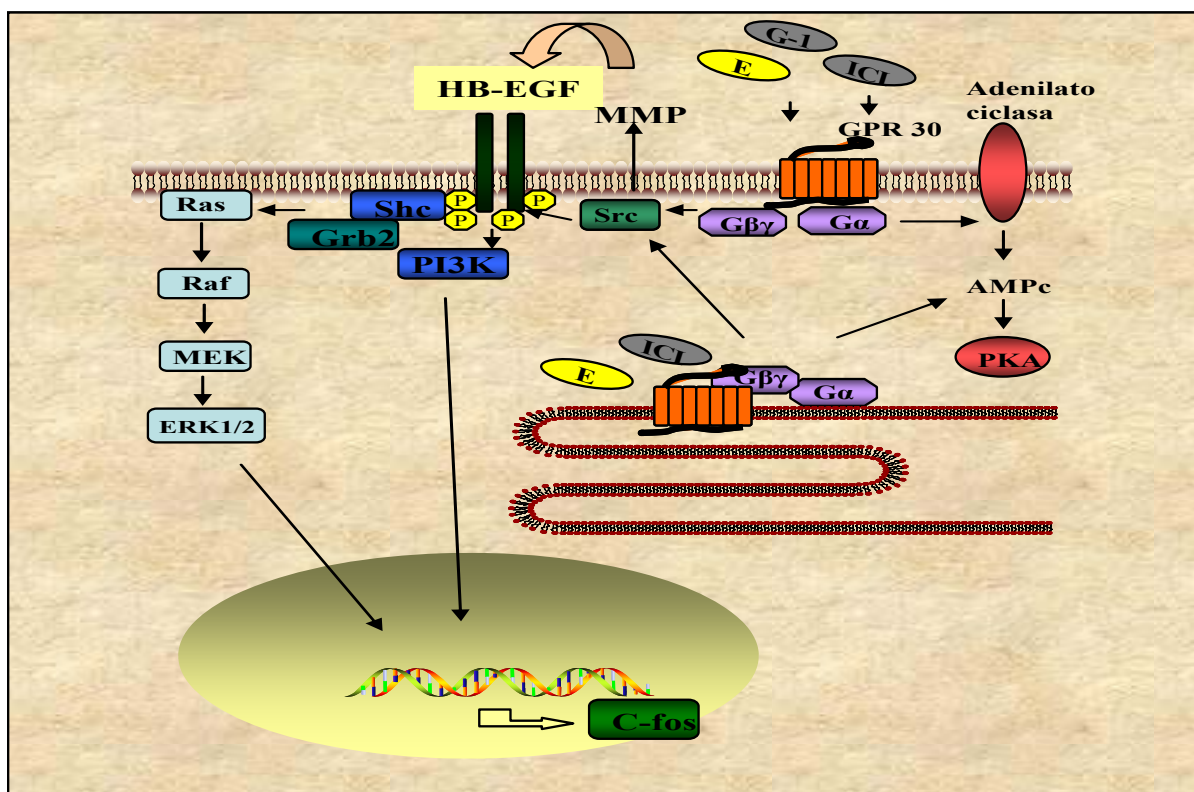
5. *Mecanismos de acción de los estrógenos.*

En esta sección final se destacan las vías de señalización que se desencadenan en respuesta a la presencia de estrógenos. Nos interesan aquellas promovidas por las formas ER α y ER β , aunque citamos asimismo la señalización descrita hasta el momento para el receptor GPR30 en neuronas y en células de origen tumoral.

5.1. Señalización a través del receptor GPR30.

Una característica peculiar de este nuevo receptor de estrógenos es que presenta una especificidad diferente frente a los compuestos desarrollados como antagonistas de ER. Tanto tamoxifeno como ICI

182,780 ejercen como agonistas para este receptor (Revankar et al 2005, Filardo et al 2000, (Prossnitz et al. 2008). En una búsqueda por hallar la especificidad de unión por GPR-30 se encontró finalmente un compuesto, G-1, con unión específica a este nuevo receptor (Bologa et al. 2006). Utilizando este compuesto como agonista específico de GPR-30 se ha determinado que en neuronas hipotalámicas de rata se produce una movilización de calcio intracelular en respuesta a su activación. Tanto este agonista específico como el desarrollo de ratones KO para GPR30 permitirán describir la señalización desencadenada por este receptor con respuesta a diferentes compuestos estrogénicos y su función en cerebro que todavía sigue siendo un tema a debatir (Otto et al. 2009).

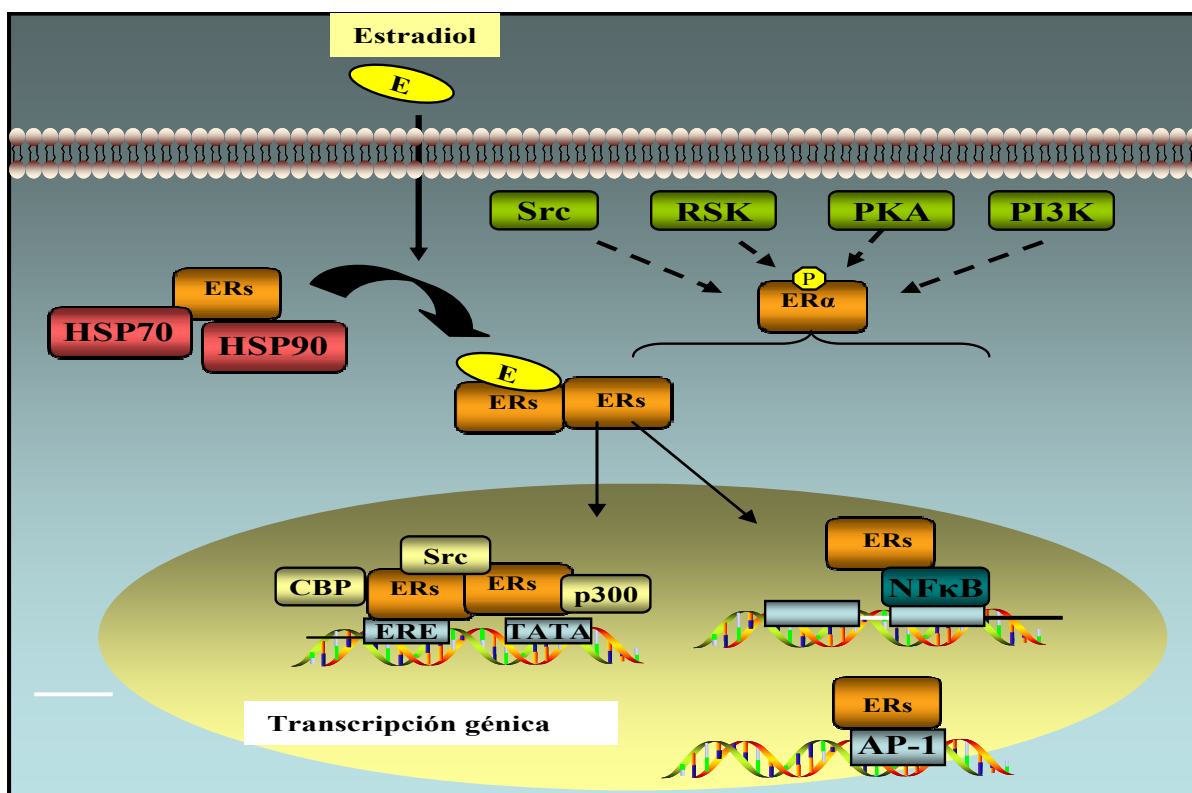


Esquema 9. Vías de activación a través de GPR-30 propuestas en líneas tumorales. En líneas de origen tumoral se ha observado un aumento en la producción de AMPc tras la activación de GPR-30. Parece que parte de estos efectos están mediados por la interacción de GPR-30 con proteínas G heterotriméricas que darían lugar en líneas tumorales a la activación de Src, aumento en la actividad de MMPs y posterior activación interacción de otros receptores de la membrana plasmática y sus rutas citoplasmáticas (Filardo and Thomas 2005). Una de las vías que responde a la activación de GPR-30 en células MDA-MB-231, negativas para ER α /ER β , es la vía de MAPK

5.2. Acción Nuclear o “Acción genómica” a través de ER α y ER β .

Se describió inicialmente el mecanismo de activación de ERs como miembros de la superfamilia de receptores nucleares (**Esquema 10**). Es bien conocida su interacción con chaperonas de la familia de HSP en ausencia de hormonas, entre ellas HSP90 y HSP70, que además de proporcionar estabilidad estructural a los receptores de estrógenos y mantenerlos en estado inhibido (Fliss et al. 2000) parecen desempeñar un papel activo en el mecanismo de activación tras la llegada del ligando (Pratt and Toft 1997) (Godowski et al 1989). Las HSPs interaccionan con los ERs a través del dominio de unión al

ligando de éstos, con la llegada de la hormona se produce la disociación de ER y HSPs y se favorece la formación de los dímeros de ERs y su translocación al núcleo. Los receptores ER α y ER β actúan como factores de transcripción por su interacción con secuencias específicas en el ADN (sitios ERE) y co-activadores de la transcripción (McKenna et al. 1999) regulando la expresión génica (Jensen et al. 1968). Los genes activados en respuesta a estrógenos corresponden al favorecimiento de la supervivencia celular entre otros, con la expresión de Bcl2 en neuronas (Garcia-Segura et al, 1998), la expresión de Bcl-XL (Patrone et al. 1999) o la de BDNF o NGF en hipocampo (Miranda et al. 1994; Sohrabji et al. 1995). Además de la interacción con las secuencias ERE se han descrito otros mecanismos de regulación génica en respuesta a estrógenos, como la interacción de ER con elementos de respuesta AP1, al que se unen los factores de transcripción Fos y Jun (Kushner et al. 2000) o NFkB (Chu et al. 2004).



Esquema 10. Resumen de la **señalización genómica de ERs**. En el esquema viene representada tanto la activación de la expresión génica mediada por la interacción de estradiol con sus receptores como la que promueven quinasas como Src, Rsk, PKA, PI3K o alguna de sus dianas por fosforilación directa de ERs como resumen de los datos propuestos en la bibliografía obtenidos a partir de diferentes tipos celulares. En el núcleo se representan las diferentes regiones de los promotores génicos que pueden interaccionar con ERs: ERE (elementos de respuesta a estrógenos), sitios AP-1 o en complejo con NFkB sobre sus secuencias específicas.

La capacidad transcripcional de ER puede ser modificada por la activación de quinasas intracelulares entre ellas la activación de PI3K (Mendez and Garcia-Segura 2006) y en muchos casos tiene lugar una

fosforilación de ER en residuos que favorecen o disminuyen la capacidad de originar el complejo de transactivación necesario para la expresión génica (ver apartado 4.5).

Cabe señalar la posibilidad de la inhibición de la expresión génica por la formación de un complejo estradiol-ERs en algunos promotores con represores de la transcripción (Hall et al. 2001).

5.3. Vías de señalización citoplásmicas o de “Acción rápida” mediante los ERs.

Entre las vías con las que interaccionan los receptores de estrógenos nos interesa particularmente la interacción descrita con la vía de Insulina/IGF-1-PI3K y que juega un papel importante en la supervivencia y neuroprotección neuronal así como en neuritogénesis.

Con los datos que existen puede clasificarse la interacción en dos sentidos: 1) la modulación de la función de ER α a través de la ruta de activación que sigue a la estimulación del receptor de insulina/IGF-1 (Mendez and Garcia-Segura 2006) y viceversa, 2) la activación de varios componentes de la vía de señalización de PI3K por estradiol-ER (Cardona-Gomez et al. 2004; Ivanova et al. 2002).

La actividad transcripcional mediada por ERs puede modificarse con la llegada de otros factores de crecimiento, tal es el caso del factor de crecimiento tipo insulina 1 (IGF-1). Se ha descrito ampliamente su capacidad de promover la expresión génica dirigida por sitios ERE. La insulina y su ruta de señalización muestran una clara dependencia y cooperación con las acciones del estradiol en muchos de los efectos que ambos compuestos muestran en cerebro (Cardona-Gomez et al. 2002b; Mendez et al. 2005). Por otra parte, datos previos confirman la activación de PI3K con la adición de estradiol en neuronas de hipocampo resultando en la activación de Akt e inhibición de GSK3 (Cardona-Gomez et al. 2004).

Así, ambas vías de transducción de señales, tanto las inducidas por estradiol como por insulina convergen en el inicio de la señalización, evento próximo a la membrana plasmática, con la interacción de ER α y p85 (subunidad reguladora de PI3K) descrito en el cerebro (Cardona-Gomez et al. 2001; Cardona-Gomez et al. 2002a; Mendez et al. 2003) y en otros tipos celulares (Manavathi et al. 2006, (Castoria et al. 2001; Greger et al. 2007). A partir de este complejo sucede la activación de PI3K, quinasa que como se ha indicado anteriormente juega un papel central en la modulación de diferentes funciones celulares, entre ellas la dinámica del citoesqueleto o el control de la transcripción.

OBJETIVOS

OBJETIVOS.

El objetivo general de este trabajo es profundizar en el estudio de las funciones de los receptores de estrógenos y su incidencia en el desarrollo neuronal desde una perspectiva de biología celular. Datos previos ya indicaban que los receptores, tanto α como β , están presentes en diferentes regiones del cerebro entre ellas en corteza e hipocampo. Por otro lado nuestro laboratorio, entre otros, había demostrado que los receptores forman parte de una vía de señalización citosólica en la que, al menos ER α , interacciona con PI3K. La actividad de PI3K resulta esencial para el desarrollo axonal y varias de sus dianas modifican el desarrollo y la maduración de la neurona.

Partiendo de estos datos previos nos planteamos estudiar la posible implicación de ERs en la morfología de neuronas de hipocampo, y las rutas de señalización citosólica que se desencadenan tras la activación de sus receptores e interacción con la vía PI3K-Akt.

Los principales objetivos que nos planteamos al inicio de este trabajo son los siguientes:

- 1- Determinar la expresión y localización de ER α y ER β en neuronas primarias.
- 2- Detallar el efecto de estradiol, a través de su interacción con ER α y ER β en la morfología neuronal.
- 3- Analizar más en profundidad la interacción de ERs con PI3K, en concreto, las rutas de señalización activadas por estradiol a partir de la activación de la actividad de Akt/GSK3- β -catenina y Akt/mTORC1.
- 4- Estudiar de la posible implicación de estas vías de señalización sobre el efecto mediado por ERs en la morfología neuronal.

Sin dejar de tener en cuenta la acción nuclear que ejercen los receptores de estrógenos mediante la activación génica, con estos objetivos pretendemos ampliar el conocimiento de la influencia de esta hormona en el desarrollo neuronal, y en qué medida lo hace a través de la señalización citosólica.

MATERIALES y MÉTODOS

MATERIALES y MÉTODOS.

1. Tipos de células utilizadas.

1.1 Neuroblastoma N2a (CCL-ATCC). Este neuroblastoma es originario de tumor murino, se obtuvo a partir de la *American type culture collection* (ATCC, Manassas, VA, USA), se creció a 37 °C y 5% CO₂ en DMEM-10% suero (GIBCO) y Glutamina 2mM. Antes de los tratamientos, se sustituyó por el medio por DMEM-sin rojo fenol y sin suero. Los compuestos utilizados para los tratamientos son: 17-β-estradiol (SIGMA), ICI 182,780 (Tocris), proteína recombinante Wnt3a (R&D systems) y los agonistas de los receptores de estrógenos: DPN (específico de ERα) y PPT (específico de ERβ). Para los controles se utilizaron los disolventes en los que se encuentra cada uno de ellos: etanol en el caso de estradiol, DMSO para ICI 182,780 y PBS-BSA 0,1% (*Albumin bovine serum fatty acid free, low endotoxin* SIGMA) como control del tratamiento con Wnt3a. Utilizamos también para la obtención de extractos totales la línea de neuroblastoma murino **NIE-115 (CRL 2263-ATCC)** que se mantuvo en idénticas condiciones.

1.2. Líneas celulares de origen no-neuronal: Línea celular HEK 293T (CRC-1573-ATCC). Esta línea celular proviene de tejido renal humano embrionario y fue obtenida de la ATCC. Las células HEK293 han sido utilizadas como células empaquetadoras de partículas virales (ver apartado 14). Se mantuvieron en un incubador a 37°C y 5% CO₂ en un medio de cultivo idéntico al descrito para las células N2a. **Línea celular MDA-MB-231.** Estas células de origen humano proceden de adenocarcinoma de glándula mamaria y se han utilizado en este trabajo por su descripción en la literatura como una línea celular carente de receptores de estrógenos.

1.3. Neuronas primarias de corteza e hipocampo. Para el uso de los animales para experimentación se siguieron estrictamente las normas implantadas por la Unión Europea (86/609/EEC). Se obtuvieron neuronas procedentes de la corteza cerebral e hipocampo de embriones de ratón de 18 días de la cepa Swiss siguiendo el protocolo descrito por el grupo de Banker (Kaeck and Banker 2006). La disección de la corteza o de hipocampo se realizó en medio “*Hanks Buffer Salt Solution Ca²⁺ and Mg²⁺ free*” (HBSS 1X, GIBCO). La digestión del tejido diseccionado se realizó con 0.25% tripsina (GIBCO) y 1 mg/ml DNasa (Roche). En el caso del hipocampo esta incubación se realizó sólo en presencia de DNase. Al medio de plaqueo de las neuronas: MEM, 20% Glucosa, suero de caballo (*Horse Serum heat inactivated*, Invitrogen, New Zeland) y antibióticos, se le añadió el número final de células deseado (6x10⁵ células/P60 para inmunocitoquímica, 2x10⁶ para *Western blot*) y finalmente, se plaquearon sobre poli-lisina (1 mg/ml) preparada en tampón borato pH 8.5 (Poli-L-Lysine hydrobromide, Sigma). Al cabo de 3h en este medio, las neuronas se han adherido al sustrato poli-lisina, esto permite cambiar el medio a NB-sin rojo fenol (*Neurobasal Medium- fenol red free*, GIBCO, Invitrogen) suplementado con B27 (GIBCO, Invitrogen), Glutamax (GIBCO, Invitrogen), antibióticos. Este medio permite a las células seguir su desarrollo. Las neuronas se mantuvieron en estas condiciones hasta su análisis.

2. Análisis de proteínas por electrotransferencia e inmunodetección (*western-blot*).

Se prepararon los extractos celulares en tampón de lisis (200 mM Hepes pH 7.4, 100mM NaCl, 100mM NaF, 1 mM Na₃VO₄, 5 mM EDTA, 1% Triton X-100 e inhibidores de proteasas (Cóctel de inhibidores de proteasas, COMPLETE™ Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania). Se lisaron las células en hielo durante 30 minutos. Tras añadir tampón de carga (Tris pH 6.8 325mM, SDS 10%, Glicerol 25%, β-mercaptoetanol y azul de bromofenol) y hervir cada muestra durante 10 minutos, se cargaron en geles de electroforesis (Tris/Glycine SDS-Polyacrylamide) siguiendo el método descrito por Laemmli (Laemmli 1970). El porcentaje de acrilamida utilizado para resolver las bandas de proteínas varían entre 6%-8%-12% en función del tamaño de la proteína a analizar. La transferencia de las proteínas a la membrana de nitrocelulosa (*Nitrocellulose Transfer Membrane*, PROTRAN-Whatman, Germany) tiene lugar en húmedo a 300 mA durante 120 min en presencia de 20% methanol y 0.1% SDS siguiendo la metodología descrita por Towin y sus colaboradores (1970). Para bloquear señal no específica se incuban las membranas durante 1h en PBS-Tween-20 (PBT)-leche 2,5%.

Los anticuerpos primarios utilizados aparecen especificados en la **tabla 1**, todos ellos se incubaron durante una noche a 4°C o 2h a temperatura ambiente. Los anticuerpos secundarios conjugados a la peroxidasa se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, EEUU) y se utilizaron a una dilución de 1:5000. La detección de la peroxidasa tiene lugar mediante un sistema de quimioluminiscencia (*Enhanced chemiluminescence Detection system*, ECL, Perkin Elmer Life Science) que se cuantificó en un densitómetro modelo GS-710 (Biorad, Life Science Research, CA, USA) y el software “*Quantity one*”. Los datos obtenidos procedentes de al menos tres ensayos independientes se representaron haciendo la relación de la señal cuantificada en relación a la obtenida con un anticuerpo del control de carga total de proteína. Los valores estadísticos entre datos procedentes de varios experimentos independientes se calcularon con la prueba *t-test de Student*.

Antígeno	Anticuerpo	Clase	WB/IC	Procedencia
ERα	MC-20, sc-542	Policlonal conejo	1:1000/1:400	Santa Cruz Biotech.
ERα	H-184, sc-7207	Policlonal conejo	1:800/1:400	Santa Cruz Biotech
ERα	ER α (Dominio de unión a ADN)	Monoclonal ratón	1:800/1:400	Abcam
ERβ	H-150, sc-8974	Policlonal conejo	1:1000/1:400	Santa Cruz Biotech.
ERβ	ER β	Policlonal conejo	1:800	Abcam
Nucleolina	Nucleolin, sc-13057	Policlonal conejo	1:1000	Santa Cruz Biotech
Proteína verde fluorescente	GFP	Policlonal conejo	1:400 (IC)	Invitrogen
β-catenina	Total β -catenin	Monoclonal ratón	1:1000/1:400	BD Bioscience
β-catenina fosforilada en Ser^{33,37}/Thr⁴¹	PS ^{33,37} /T ⁴¹ - β -catenin	Policlonal conejo	1:1000	Cell Signaling Tech.
β-catenina fosforilada en Ser45	PSer ⁴⁵ - β -catenin	Monoclonal ratón	1:500	Sigma
N-terminal no fosforilado de β-catenina	ABC antibody, clone 8E7	Monoclonal ratón	1:500	Upstate (Millipore)
APC, adenomatous poliposis coli	APC, C-20, sc-896	Policlonal conejo	1:800	Santa Cruz Biotech
Dominio <i>HMGB</i>ox LEF-1	LEF1-HMGB	Monoclonal ratón	1:1000	Sigma
N-terminal LEF-1	N17-LEF1	Policlonal cabra	1:800	Santa Cruz Biotech
Ciclina D1	CyclinD1	Monoclonal ratón	1:800	MBL
Ciclina D2	CyclinD2	Monoclonal ratón	1:800	MBL
GSK3α/β fosforilada en Ser^{21,9}	PSer ^{9,21} GSK3 α/β	Policlonal conejo	1:1000	Cell Signaling Tech.
GSK3α, GSK3β	GSK3 total	Monoclonal ratón	1:1000	Biosource
AKT	AKT total	Policlonal conejo	1:1000	Cell Signaling Tech.
AKT fosforilado en Thr³⁰⁸	PThr ³⁰⁸ Akt	Policlonal conejo	1:1000	Cell Signaling Tech.
AKT fosforilado en Ser 473	PSer ⁴⁷³ Akt	Policlonal conejo	1:1000	Cell Signaling Tech
ERK fosforilado en Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴	P-ERK	Monoclonal ratón	1:1000	Cell Signaling Tech.
N-cadherin	N-cadherin, A-CAM	Monoclonal ratón	1:800	Sigma
E-cadherin	E-cadherin, H-108, sc-7870	Policlonal conejo	1:1000	Santa Cruz Biotech

Metaloproteasa de la matriz 2	MMP2, (H-76) sc-10736	Policlonal conejo	1:800	Santa Cruz Biotech
Metaloproteasa de la matriz 9	MMP9 (Ab-10)	Monoclonal ratón	1:800	Calbiochem
Plasminógeno	Plg	Policlonal conejo	1:800	Cedido por Pilar (American Diagnostica, Inc.)
Actina	Actin	Monoclonal ratón	1:1000	Sigma
Oncogen c-myc	c-myc, sc-788	Policlonal conejo	1:1000	Santa Cruz Biotech.
TCF1	Tcf1 sc-13025	Policlonal conejo	1:800	Santa Cruz Biotech
TCF3	Tcf3 sc-8635	Policlonal cabra	1:800	Santa Cruz Biotech
Isoforma β-III tubulina	β -III tubulin	Monoclonal ratón	1:1000	Promega
β-galactosidasa de E. coli	β -galactosidase (Z3781)	Monoclonal ratón	1:1000/1:1000	Promega
Espectrina	Anti-spectrin (nonerythroid)	Monoclonal ratón	1:1000	Chemicon International
Proteína ribosomal S6	S6 (5G10)	Policlonal conejo	1:1000	Cell Signaling Tech.
Proteína ribosomal S6 fosforilada en Ser235/236	Phospho-S6	Policlonal conejo	1:1000	Cell Signaling Tech.
Lamina B1	LaminB1 (S-20)	Policlonal cabra	1:1000	Santa Cruz Biotech.
Proteína de asociación microtúbulos MAP2	MAP2	Monoclonal ratón	1:1000	Sigma
Ikba fosforilada	P-Ikba	Policlonal conejo	1:250	Cell Signaling Tech.
Tau defosforilada	Tau-1	Monoclonal ratón	1:1000	Covance
Neurofilamentos fosforilados	SMI-31	Monoclonal ratón	1:1000	Covance

Tabla 1. Anticuerpos utilizados, procedencia y dilución de uso en western blot o inmunocitoquímica.

3. Transfección transitoria de N2a.

Los plásmidos utilizados se resumen en la **tabla 2**. En el caso de la medida de actividad luciferasa, se utilizaron los siguientes plásmidos: pTOPflash (cedido por García-Segura LM, Upstate), que contiene 3 copias de la secuencia de ADN que reconoce la familia de proteínas de factores de transcripción TCF/LEF (CCTTTGATC) además del promotor de c-Fos dirigiendo la expresión del gen de β -galactosidasa, pFOPflash (cedido por García-Segura, LM, Upstate) que contiene 3 copias no funcionales del sitio de unión de las proteínas TCF/LEF (CCTTTGGCC). EGFP-N1, que expresa la proteína verde fluorescente, se utilizó para cuantificar la eficiencia de la transfección. (**Tabla 2**)

PLÁSMIDO	INSERTO	PROCEDENCIA
pCL-NEO- β catenin	Construcciones: Δ 45- β catenina y S33Y β catenina	Vogelstein, B.
pcDNA3.1	Plásmido cDNA 3.1 vacío	Invitrogen
TOPFlash	3x sitios de unión TCF + prom TK+ gen luciferasa	Upstate
FOPFlash	3x sitios de unión TCF mutados + prom TK+ gen luciferasa	Upstate
pENP1	Fragmento -2804 a -91 del promotor de Engrailed 2 (<i>Xenopus laevis</i>) + gen luciferasa	Moon, RT.
pCG Δ 56	Δ 56 LEF-1 (<i>Homo sapiens</i>)	Groscheld, R.
pEGFP-N1	Proteína GFP (“enhanced”)	Clontech
scRNA	Secuencia aleatoria (“scrambled”)	Sigma
siER α (vector de interferencia)*	*indicada en la tabla 3 (<i>Mus musculus</i>)	Sigma
siER β (vector de interferencia)*	*indicada en la tabla 3 (<i>Mus musculus</i>)	Sigma
pM2D.G	Cubierta lentiviral (VSV)	(Naldini et al. 1996)
pCMV Δ R8.2	Proteínas virales excepto cubierta lentiviral	(Naldini et al. 1996)
RhebQ64L	Forma activa constitutiva de Rheb (<i>Homo sapiens</i>)	(Jiang and Vogt 2008)
S6K1 wt	Proteína S6K 1 (<i>Rattus norvegicus</i>)	Addgene

Tabla 2. Plásmidos de expresión de proteínas, repoteros de actividad luciferasa y construcciones utilizadas para el empaquetamiento lentiviral o la supresión de expresión génica .

La línea celular N2a se transfectó utilizando LipofectAMINE 2000 (Invitrogen) y siguiendo la recomendaciones de la casa comercial. 24 horas antes de la transfección, el medio de mantenimiento de la línea se sustituyó por DMEM-0% FCS sin antibióticos. La proporción empleada de ADN/ LipofectAMINE es la siguiente: 2 μ l de LipofectAMINE (GIBCO, Invitrogen) y 1 μ g de ADN total (0.75 μ g TOP/FOP más 0.25 μ g EGFP-N1). Después de la transfección, el medio se cambió por DMEM-sin rojo fenol-0% suero con antibióticos. Los tratamientos se realizaron entre 30-48 horas después de la transfección coincidiendo con el máximo de expresión del plásmido observado. Para la introducción de los plásmidos utilizados tanto en el empaquetamiento de partículas virales como para la interferencia en la expresión de los receptores de estrógenos ver apartado 15.

4. Ensayo de medida de actividad luciferasa.

Después de los tratamientos a las células N2a transfectadas con TOP/FOPFlash, se siguió el protocolo descrito previamente en la literatura en el que las células se incuban en tampón TEN (40 mM Tris-HCl

pH 7.5, 10 mM EDTA, 150 mM NaCl) para favorecer que las células se despeguen de la placa, tras lo cual se recogen y centrifugan.

El pellet de células obtenido se resuspendió en 100 μ l de tampón de lisis (100 mM tampón fosfato potásico pH 7.8, 1 mM DTT, 0.5% Triton) y se incubó en hielo 30 min. El lisado se centrifugó finalmente a 4°C, 5 min para eliminar posibles agregados.

Una parte de este sobrenadante puede cargarse en un gel de electroforesis para determinar la cantidad de proteína total en cada caso. El resto, se utiliza para la medida de la actividad luciferasa (Garcia et al. 2007; Martinez-Salas et al. 1989). Para ello, utilizamos el tampón de luciferasa consistente en 25mM Glicil-glicina, 15mM MgSO₄, 5mM ATP (SIGMA), 1mM DTT, 100 μ g/ml BSA (*Albumin from bovine serum*, SIGMA). Se mezclaron 200 μ l de este tampón con 20 μ l del extracto celular.

El sustrato de la reacción, luciferina, se obtiene comercialmente (Promega) y se utiliza a una concentración de 1 mM (disuelta en agua estéril). Durante la reacción, en la cual la luciferina se convierte en oxiluciferina, se emite cierta cantidad de luz en función de la cantidad de luciferasa que se ha expresado en las células. Esta emisión de luz se detecta a 560 nm con la ayuda de un luminómetro (Monolight® 2010, Analytical Luminescence Laboratory). Los valores fueron normalizados respecto al control en cada experimento independiente y se calculó el valor estadístico entre los diferentes ensayos.

5. Inmunoprecipitación.

Para ensayos de inmunoprecipitación seguimos el protocolo descrito (Transduction Laboratories), partimos de células N2a confluentes que se recogen en tampón de inmunoprecipitación A (1% Triton X-100, 150 mM NaCl, 10mM Tris pH 7.4, 1 mM EDTA pH8, 1 mM EGTA pH8, 0.2 mM orto-vanadato sódico, 0.2 mM PMSF, 0,5% NP-40). El lisado se centrifuga (16.000 x g, 4°C, 15 min) para eliminar agregados. En el caso de la utilización de tejido para la inmunoprecipitación, éste fue homogenizado en el mismo tampón y centrifugado a 30.000 rpm durante 30 minutos en un rotor TL 100.3 para eliminar agregados y seleccionar el soluble. El sobrenadante (100 μ l de lisado total nativo) se incubó en el siguiente tampón: 2% Triton X-100, 20 mM Tris pH 7.4, 2 mM EDTA pH 8., 2 mM EGTA pH 8, 0.4 mM ortovanadato sódico, 0.4 mM PMSF, 1% NP-40) en presencia de 5 μ g de anticuerpo anti-ER α en un volumen total de 500 μ l. La mezcla se incubó durante 1h a 4°C. Después de la incubación, se añadieron 30 μ l de ProtG:Sepharose (GE Healthcare) previamente hidratada en PBS1X-Azida sódica 0,01% y se incubó de nuevo durante 30 min en agitación a 4°C. Tras la incubación se centrifugó 4 min a 16.000 x g, 4°C. El pellet se lavó tres veces en el tampón A descrito anteriormente (16.000 x g, 4°C). El pellet final se resuspendió en 30 μ l de tampón de carga de electroforesis 2X (250 mM Tris pH 6.8, 4% SDS, 10% glicerol, 0.006% azul de bromofenol, 2% β -mercaptoetanol), se hierve durante 10 minutos y se escoge la fracción del sobrenadante de una centrifugación final de 5 min (16000 x g, 4°C). Para los controles negativos de la inmunoprecipitación se utilizó un anticuerpo irrelevante o suero preinmune del mismo origen que el anticuerpo utilizado

para la proteína de interés. Se calibró la cantidad de inmunoprecipitado presente en función de la cantidad de IgGs presentes en cada ensayo de inmunoprecipitación.

6. Obtención de microtúbulos de primer ciclo.

Para la polimerización de tubulina a partir de extracto total de cerebro embrionario de 18 días de gestación se siguió el procedimiento descrito en la bibliografía (Shelanski et al. 1973). Las fracciones obtenidas en el proceso fueron guardadas para su posterior caracterización mediante geles de acrilamida que se tiñeron con Coomassie o se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa para su incubación con los anticuerpos control para determinar el enriquecimiento en tubulina en el pellet de microtúbulos.

7. Fraccionamiento subcelular por gradiente de sacarosa.

Para obtener las fracciones correspondientes a citosol, membrana y núcleos de las células N2a, seguimos el protocolo descrito anteriormente (Perez Martinez et al. 1996). Obtuvimos el lisado celular en 300 μ l de tampón “A” (sacarosa 0,32 M, Tris pH 7.4, 10 mM, $MgCl_2$ 3mM suplementado con inhibidores de proteasas y ácido okadaico) al que se le añadió 0,05% de NP-40 (Nonidet-40, Roche, Alemania). El lisado total se homogenizó y centrifugó a 2500 rpm durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante obtenido es la fracción citosólica que se guardó para analizar. El pellet se resuspendió en el tampón “A” de nuevo sin detergente y se centrifugó a 2500 rpm durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante corresponde a la fracción de membranas y se guardó para análisis. El pellet se resuspendió en el tampón “B” (sacarosa 1,9 M, Tris pH 7.4 10mM, $MgCl_2$ 3 mM) y se colocó sobre un colchón de sacarosa de 3ml (tampón “C” idéntico al tampón “B” salvo en la concentración de sacarosa que queda en 2M). Se centrifugó a continuación a 10000 rpm en una centrífuga SORVALL con un rotor HB4 durante 1h a 4°C. El pellet final es el que contiene los núcleos y se resuspendió en 100 μ l del tampón A. Se añadió tampón de carga a cada una de las fracciones obtenidas para analizar en geles de acrilamida.

8. Ensayo de retardo en gel (*Electrophoretic Mobility Shift Assay, EMSA*).

Para el ensayo EMSA se siguió el procedimiento descrito previamente en trabajos del grupo del Dr. Antonio Nieto (Garcia et al. 2007; Perez Martinez et al. 1996).

8.1 Extracción de proteínas nucleares. Para obtener extracto nuclear a partir de células N2a o neuronas primarias de corteza se siguió el procedimiento descrito anteriormente (Perez Martinez et al. 1996). Se añadió el tampón (10 mM Tris pH 7.5, 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 1 mM DTT, PMSF, 1 μ M Na_3VO_4 e inhibidores de proteasas) y se incubaron las células 15 minutos en hielo. Tras añadir NP-40 10%, los núcleos se centrifugaron (30 segundos) y se resuspendieron en seco en el vórtex. Una vez resuspendidos se añadió el tampón: 20 mM Tris pH 7.5, 400 mM NaCl, 0.5 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 2mM $MgCl_2$, 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF, 1 μ M Na_3VO_4 e inhibidores de proteasas). Esta concentración salina permite la disociación de la interacción proteína-ADN. Los extractos nucleares se incubaron en este tampón a 4°C y con agitación intensa durante 15 minutos.

Las muestras fueron después centrifugadas a alta velocidad durante 30 segundos. Finalmente, el sobrenadante obtenido es el extracto de proteínas nucleares.

8.2 Generación de oligos con unión específica a las proteínas de estudio (TCFs) y marcaje con $^{35}\gamma$ -ATP. Se mandaron sintetizar las sondas de ADN con las secuencias específicas para la interacción con las proteínas TCF extraídas del núcleo basándonos en las secuencias de unión de TCFs presentes en el plásmido TOPFlash. Las sondas son: “TOP directo” para la secuencia idéntica a la presente en el plásmido TOPFlash y “TOP inverso” que es la complementaria a la anterior; “FOP directo” para la secuencia mutada para la no-interacción con proteínas TCF y “FOP inverso” que es su complementaria. Para que las proteínas TCF se asocien al ADN necesitan que éste se encuentre en forma de doble cadena puesto que estas proteínas se unen al genoma por el surco mayor del ADN. Se añadieron a las secuencias cuatro nucleótidos en su extremo 5' (GTCG) solamente, de forma que cuando se produce la hibridación de los oligos quedan estos cuatro nucleótidos sin anillar. El hecho de que queden extremos no romos (extremos adhesivos) facilita la actividad de la enzima quinasa utilizada en el marcaje del ADN.

8.3. Para la **hibridación de las sondas**, preparamos los oligos a una concentración de 1 mg/ml e incubamos las parejas complementarias (directo e inverso de TOP y FOP, 50µg de cada uno) a 70°C durante 10 minutos en un baño. Transcurrido este tiempo, se dejó la mezcla de oligos enfriándose paulatinamente en el baño durante la noche. Se comprobó en un gel de agarosa 4.5% con bromuro de etidio (BrEt) la hibridación de los oligos cargando la misma cantidad de oligos de cadena sencilla, detectando en éstos una mayor señal de BrEt puesto que la doble cadena de ADN absorbe más compuesto intercalante que las cadenas sencillas.

8.4. El **marcaje con $^{35}\gamma$ -ATP** de estos oligos anillados se realizó preparando en primer lugar la siguiente mezcla: 0.3 µl del oligo anillado (TOP o FOP), 1.5µl del tampón de la enzima ADN-quinasa PNK 10x (Roche Applied Science, Spain), 1µl de la enzima PNK y 30µCi de $^{35}\gamma$ -ATP (GE Healthcare, UK) en un volumen final de 15µl. Esta mezcla se incubó durante 1h y media a 37°C. Para parar la reacción se añadió 15 mM EDTA que se incubó durante 1 minuto. A continuación se llevo a cabo la purificación de la sonda marcada, añadiendo TE hasta 200µl y 40µl de DEAE-celulosa preparada en TE 1:1. Se incubó 10 minutos a temperatura ambiente agitando de vez en cuando. De esta forma, el ADN fosforilado con γ -ATP queda embebido en DEAE-celulosa. Se centrifugó y se retiró el sobrenadante. El pellet se lavó tres veces con 300 µl de TE con 0.2M NaCl. Una vez lavado, se eluyó el pellet (dos veces) con 150 µl de TE con 0.6M NaCl. El volumen total eluido se filtró (MICROPURE) centrifugando 1 minuto. Se añadieron a continuación 2.5 volúmenes de EtOH y 1µl de glucógeno 20mg/ml y se incubó 15 minutos en nieve carbónica. Tras la incubación, se centrifugó durante 15 minutos y se lavó con EtOH 75% y por último se secó y resuspendió en TE dejando la sonda marcada a una concentración aproximada de 1ng/µl. Se contabilizaron después las cuentas por minuto (cpm) de las sondas marcadas utilizando para ello 1µl de éstas. El número de cpm obtenido siguiendo este procedimiento es en torno a 50.000 cpm/µl.

8.5. Reacción de interacción de las proteínas nucleares con la sonda de ADN marcada. La interacción de la proteína de interés con el oligo previamente diseñado y marcado radiactivamente se realizó utilizando 20 µg del extracto de proteínas durante 30 min a temperatura ambiente. A la reacción de interacción se le añadió 1 µl del oligo con secuencias de unión de las proteínas de la familia TCF/LEF (1mg/ml) (**Tabla 4**).

En los casos en los que se buscaba ver un super-retardo en el gel, se añadieron a la mezcla los siguientes anticuerpos en cada caso: 2 µg de TCF-1-X, TCF-3-X y LEF-1-X (Santa Cruz) y 1 µg de β -catenina (Transduction Labs) o 0.8 µg ER- α (MC-20, Santa Cruz y anti-N terminal) , todos ellos se añadieron 20 min antes de que finalizara la reacción.

Se realizaron además ensayos de competición con el fin de detectar las bandas específicas de la unión de proteínas TCF/LEF a la secuencia del oligo. Los ensayos de competición se realizaron utilizando un oligo con la secuencia de interés mutada (secuencia directa: 5'-GTCGCCCTTTGGCCTTACC-3', inversa: 5'-GTCGGGTAAGGCCAAAGGG-3', ver Tabla 4) y con la secuencia del oligo correcta pero sin marcar con radiactividad. Las cantidades añadidas de estos oligos fueron de 20 ng y 100 ng.

En todos los casos, la reacción de interacción de las proteínas con los oligos se hizo en presencia de una concentración final de 60-65 mM de KCl y en presencia de poli-dIdC (1 mg/ml) y CHAPS (20%). La cantidad de KCl añadido es la necesaria para que la concentración salina final de la reacción sea de 65mM teniendo en cuenta el aporte de sal de los extractos nucleares. La concentración salina es delimitante puesto que ésta determina la capacidad de unión de las proteínas de unión al ADN y se necesita una unión específica, además unas condiciones demasiado permisivas para esta interacción (concentración menor) permitiría la interacción de otras proteínas generales como las histonas enmascarando cualquier posible resultado.

Los resultados de la interacción proteína-ADN se analizaron en un gel de acrilamida/ bisacrilamida (Biorad) del 4.5% y a un voltaje constante de 130 V, finalmente se secó el gel a 80 °C, 1h. El gel se expuso sobre una película autorradiográfica a -70°C durante el tiempo suficiente en cada caso (12-24-72h) en función de la señal de radiactividad del gel.

9. Ratones transgénicos TCF/LEF-LacZ.

9.1. Genotipado de los ratones. La colonia de ratones transgénicos que contienen el gen *lacZ* bajo el control del promotor de c-fos con tres repeticiones añadidas de la secuencia que reconocen las proteínas TCF/LEF fue descrito por la Dra. E. Fusch (DasGupta and Fuchs 1999) (nombre de la cepa: *Tg(Fos-lacZ)34Efu*). El genotipado de la colonia se realizó mediante PCR (ver apartado 11.3) utilizando los pares de oligos indicados en la **tabla 4** obteniendo como producto la amplificación de un fragmento de 315 pb para el gen *LacZ* y de 210 pb para el gen endógeno control. De manera independiente se comprobó la expresión del gen *LacZ* por retrotranscripción partiendo de ARN total aislado en neuronas de corteza en cultivo. Además mediante tinción inmunocitoquímica de las neuronas de corteza se detectó la expresión de la proteína en el 100% de las células.

9.2. Detección de actividad β -galactosidasa. La colonia fue mantenida en heterocigosis y fue necesario comprobar cada embrión de forma rutinaria previamente a su utilización para la obtención de neuronas primarias. Para ello, parte del cerebelo se incubó en la solución de tinción que contiene las condiciones idóneas de la reacción que lleva a cabo la enzima codificada por el gen *lacZ*, β -galactosidasa (5 mM $K_4[Fe(CN)_6] \cdot 3H_2O$, 5 mM $K_3[Fe(CN)_6]$, 2 mM $MgCl_2$) y el sustrato de la enzima, 5-bromo-4-cloro-3-indol β D-galactósido (X-Gal, 1 mg/ml). El producto de la reacción adquiere un color azulado por lo que se hace fácil diferenciar aquellos embriones en cuyo tejido se expresa β -galactosidasa de los que no la expresan. Esta reacción tiene lugar en un tiempo que ronda los 10 minutos aunque varía en función de la cantidad de enzima presente variable sobretodo entre ratones homocigóticos y heterocigóticos.

10. Aislado de ARN total. Retrotranscripción y Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

10.1. Para el **aislado de ARN** de células N2a partimos de una placa P100 confluyente, en el caso de neuronas de corteza 3 P60 mm. Utilizamos TRIzol (GIBCO) para el aislado de RNA y finalmente se resuspende en agua estéril libre de ribonucleasas (tratada con DEPC, dietil-pirocarbonato, SIGMA). Todo el procedimiento de manipulación de ácidos nucleicos se realizó utilizando las micropipetas con puntas estériles con filtro (Promega/Molecular Bioproducts).

A continuación se realizan las medidas de absorbancia del ARN para comprobar su concentración y pureza (Nanodrop ND-1000). Posteriormente, se comprueba la calidad del ARN mediante el Bioanalizador 2100 (Agilent Technologies, EEUU), que permite ver en un gel las bandas mayoritarias del ARN y comprobar si existe degradación de las mismas.

10.2. Se sintetizó a continuación la **primera cadena de cDNA** utilizando 2 μ g de ARN y el primer inverso (ver **Tabla 4**) como se describe previamente (Moreno-Flores et al. 2003). En primer lugar, se realiza la hibridación del primer con el ARN a 37-40°C durante 5 min, después de lo cual se añaden el resto de los componentes de la reacción: transcriptasa inversa MMLV, 2.5 mM DTT, y RT-Buffer (GIBCO) con RNAsine y 10mM dNTPs. La elongación se lleva a cabo a 37°C (temperatura óptima de la enzima) añadiendo un paso final a 94°C (5 min) que la inactiva.

Se analizó la expresión de Ciclina D1, c-myc, actina and β -galactosidasa. La amplificación se desarrolló utilizando el sistema de Master *SYBR Green I* mix (Roche) con 2 mM de $MgCl_2$ en un lightcycler (Roche Molecular Biochemicals).

10.3. Amplificación por PCR. Para la reacción de amplificación se utilizó la polimerasa Taq Gold (Applied Biosystems) con su tampón correspondiente al que se añade una concentración de $MgCl_2$ de 2.5mM, una combinación de nucleótidos A-T-C-G (dNTPs), el molde de ADN y los oligos específicos para cada molde (Saiki et al. 1988). El programa estándar consta de las siguientes fases: activación de la enzima a 95°C durante 10 minutos y varios ciclos de desnaturalización del molde (95°C, 30 segundos), anillamiento (30 segundos) y extensión (72°C, 35 segundos-1 minuto). La temperatura óptima de la fase de anillamiento del programa de PCR se determinó cada par de oligos. Las secuencias de los oligos utilizadas así como las condiciones óptimas se especifican en la **tabla 4**.

11. RT-PCR cuantitativa.

Para el ensayo de amplificación cuantitativa de ADNc obtenido a partir de ARN aislado de las células en cultivo, se preparó la mezcla de PCR con los oligos específicos para actina y β -galactosidasa (**Tabla 4**) que se han mencionado en el apartado de “RT-PCR”, el molde de ADN (ADNc en este caso), $MgCl_2$, Taq polimerasa y *SYBR Green I* (LightCycler FastStart DNA Master *SYBR Green I*, Roche Molecular Biochemicals). *SYBR Green* es un compuesto intercalante en el ADN de doble cadena y constituye la base de la medida en el lightcycler, ya que su detección ocurre en función de la cantidad de ADN de doble cadena que se genera en cada ciclo de la reacción PCR. A su vez, la cantidad de ADN de doble cadena varía en función de la cantidad de ADNc del que se parte, que varía según la cantidad de ARN aislada en cada condición. La reacción tiene lugar en un volumen final de 20 μ l dentro de capilares de vidrio (LightCycler *Capillaries*, Roche). El programa de la reacción del lightcycler consta de los siguientes pasos: desnaturalización (95°C, 10min), amplificación (para actina: 94°C, 15sec, 57°C 10 sec, 72°C 20sec; 40 ciclos) y curva de *melting* (95°C 0sec, 65°C 15sec, 95°C 0 sec), finalmente enfriamiento. La curva de *melting* resulta esencial en el análisis puesto que permite diferenciar el producto específico de la reacción de amplificación de productos no específicos, como sería el caso de que los oligos formaran dímeros ya que éstos también serían marcados con *SYBR green*.

Para comprobar el correcto funcionamiento de los oligos, la posible formación de dímeros entre ellos, las condiciones del programa de amplificación y la fiabilidad de la medida cuantitativa se realizaron pruebas utilizando distintas diluciones de un ADNc con los oligos específicos para actina. Una vez comprobados los oligos, y la ausencia de amplificación cuando añadimos molde de ADN genómico, pasamos al análisis de la amplificación cuantitativa principalmente de dos genes: actina como gen constitutivo y el gen *LacZ* (que codifica la proteína β -galactosidasa). Nuestro análisis se basó en la comparación de las variaciones en la amplificación del molde de ADNc en los diferentes tratamientos y respecto a la amplificación de actina en cada caso.

12. Arrays de ARN. Microchips.

El análisis de microchips de ARN se realizó utilizando el sistema *Applied Biosystems Mouse Genome Survey Microarray*. El ARN total obtenido de las diferentes condiciones se pretrató para purificarlo con *RNeasy kit from Qiagen* (Hilden, Alemania). Las sondas de ADN cíclico generado a partir del ARN extraído fueron marcadas con digoxigenina-UTP y amplificadas a partir de la primera cadena de ADNc obtenida a partir de 1 μ g de ARN. La retro-PCR y la amplificación se llevaron a cabo con el sistema de Applied (Applied Biosystems Chemiluminescent RT-IVT labeling Kit). La hibridación de los productos obtenidos de la amplificación, la detección por quimioluminiscencia y la adquisición de imágenes se realizó de acuerdo con las indicaciones proporcionadas por la casa comercial (Applied Biosystems, 1700 Chemiluminescent Microarrays Analyzer).

Los datos se procesaron utilizando el programa de análisis de la casa comercial (Applied Biosystems Expression System) con el que se obtuvieron los datos referentes a las muestras de los cuales se eliminó la señal de fondo no específica. Los datos de la señal de las diferentes sondas de detección se trataron para obtener su valor logarítmico y se filtraron para reducir los datos a aquellos en los que la diferencia de señal en comparación con el ruido de fondo es superior a 3. Los datos finales se representan en forma de comparación de las dos poblaciones de células: cDNA3.1/N2a y Δ 56LEF-1/N2a en cada tratamiento (estradiol, Wnt3a).

13. Interferencia de la expresión de ER α y ER β .

Los vectores de interferencia de los receptores de estrógenos fueron obtenidos a través de SIGMA. Estos vectores, basados en el plásmido pLK0.1 (Moffat et al. 2006) contienen secuencias correspondientes a regiones de la secuencia del ARN de la proteína construidas en forma de horquilla de manera que su estructura secundaria una vez que hibrida con la secuencia en el ARN impide que se complete el proceso de traducción de la proteína. La casa comercial dispone de 5 vectores virales por cada isoforma del receptor según la región de la secuencia que contiene el vector (**Tabla 4**).

Fueron probados todos ellos en transfección transitoria sobre células N2a para comprobar en inmunoblot la cantidad total de las proteínas de interés, identificando de esta manera 2 de cada isoforma como los más efectivos en la supresión de la expresión de los receptores. Se trata de ER α 176, ER β 150. Éstos son los vectores seleccionados para empaquetamiento viral y transducción en neuronas primarias. Se utilizaron también como plásmidos de expresión electroporados en las neuronas desde el momento del plaqueo de éstas.

TRC No.	Secuencias para Receptor de estrógenos alpha
TRCN0000026201	CCGGCGTGTTCATGTATGCAGTTATTCTCGAGAATAACTGCATACATGACACGTTTTT
TRCN0000026184	CCGGCCCATGATCTATTCTGAATATCTCGAGATATTCAGAATAGATCATGGGTTTTT
TRCN0000026197	CCGGGCTTTCTTTAAGAGAAGCATTCTCGAGAATGCTTCTCTTAAAGAAAGCTTTTTT
TRCN0000026214	CCGGGCCGAAATGAAATGGGTGCTTCTCGAGAAGCACCCATTTCATTTCGGCTTTTTT
TRCN0000026176	CCGGCCGCCTTCTACAGGTCTAATTCTCGAGAATTAGACCTGTAGAAGGCGGTTTTT
TRC No.	Secuencias para Receptor de estrógenos beta
TRCN0000026215	CCGGGCCACGAATCAGTGTACCATACTCGAGTATGGTACACTGATTCGTGGCTTTTTT
TRCN0000026192	CCGGGCCATGACATTCTACAGTCCTCTCGAGAGGACTGTAGAATGTCATGGCTTTTTT
TRCN0000026170	CCGGGATTCTGGAAATCTTTGACATCTCGAGATGTCAAAGATTTCAGAATCTTTTTT
TRCN0000026150	CCGGCTGCTCAGCATGAAGTGCAAACTCGAGTTTGCATTTCATGCTGAGCAGTTTTT
TRCN0000026230	CCGGGCATTGCCTGAACAAAGCCAACTCGAGTTGGCTTTGTTTCAGGCAATGCTTTTTT

Tabla 3. Secuencias de interferencia para ER α y ER β de origen murino. Los números subrayados son las construcciones con las que obtenemos mayor eficiencia en la supresión de la expresión.

14. Empaquetamiento viral e infección con lentivirus.

14.1. El empaquetamiento de los vectores de interferencia de ARN se llevó a cabo en la línea celular HEK293T crecidas a una confluencia del 70% siguiendo el método descrito en (Naldini et al. 1996). En el empaquetamiento se consigue la construcción de partículas virales que contienen en su interior los plásmidos de expresión de las secuencias de interferencia en nuestro caso. Utilizamos un sistema de fabricación de partículas lentivirales, éstos tienen una alta afinidad por células del linaje neuronal. Para la síntesis de proteínas virales es necesario introducir en las células dos plásmidos: pCMVΔR, que contiene la información de todas las proteínas víricas excepto la cubierta y PM2DG, que codifica la proteína VSV que constituye la cubierta del virus. Por tanto, se necesita la existencia de ambos plásmidos en una misma célula para que se constituya la partícula viral. Además de esta medida, estos plásmidos están modificados para aumentar su bioseguridad de manera que presentan mutaciones en la secuencia de algunas de las proteínas víricas (TAT, REV) que conforman codones de finalización de la transcripción.

Para el proceso de empaquetado, se preparó por un lado la mezcla de vector siRNA (6μg) + pM2DG (3μg)+ pCMVΔR (3μg) en medio OPTIMEM (Gibco) atemperado y 24μl de PLUS REAGENT y por otro la mezcla de OPTIMEM (GIBCO) y lipofectamina plus (LipofectAMINE Plus, Life Technologies) (36μl) en un volumen de 750μl. Cada mezcla se incubó por separado durante 20 minutos a temperatura ambiente, tras este tiempo se mezcló e incubó de nuevo otros 20 minutos.

Se añadieron 3,5 ml por cada P100 de medio OPTIMEM. Una vez finalizada la incubación de la mezcla de ADNs, lipofectamina y Plus Reagent fue añadida sobre las células que permanecieron en estas condiciones durante la noche. Al día siguiente, se eliminó el medio de las células, se lavaron las placas con PBS1X y se añadió 5 ml del medio en el que se iban a realizar las infecciones de neuronas (NB-B27-Glutamax y antibióticos). En este medio se mantuvieron las células HEK293 durante 24h y se recogió el sobrenadante. Éste fue filtrado con filtros *low binding protein* de 0,45μm de tamaño de poro y dividido en los volúmenes adecuados para su uso.

14.2. Valoración de la carga viral obtenida. A continuación, para valorar la cantidad de partículas virales recogidas en el sobrenadante obtenido realizamos una serie de infecciones sobre células N2a utilizando varias diluciones del sobrenadante. Se comprobó la eficiencia de la interferencia de la expresión de la proteína de interés en inmunoblot (*western blot*). Esta serie de diluciones se realizó por cada empaquetamiento, utilizando posteriormente la dilución así determinada en los ensayos de infección en neuronas.

14.3. Infección a neuronas primarias y células N2a. La infección sobre las neuronas de corteza e hipocampo se realizó una vez transcurridas 30h del plaqueo de las neuronas para asegurar su correcta adhesión a la placa. El sobrenadante recogido anteriormente, que contiene las partículas virales con información génica de nuestras secuencias ARN de interferencia de interés (**Tablas 2 y 3**), se añade a las placas de neuronas. Transcurridas 6 horas desde la infección se hicieron lavados del medio con PBS1X y se añadió el medio definitivo para el mantenimiento de las neuronas. La interferencia sobre

la expresión de la proteína se observa ya desde el segundo día después de la infección como comprobamos mediante *western blot* con extractos totales de células infectadas.

15. Electroporación (Nucleofección) en neuronas primarias de corteza e hipocampo.

Para la electroporación se siguieron los consejos de la casa comercial (Amaxa) de la que proceden tanto el electroporador como los materiales necesarios para el proceso (Basic Nucleofector Kit for Primary Mammalian Neural cells, Amaxa Bioscience).

Se siguieron las recomendaciones expuestas por la casa comercial en cuanto al número de células por cada nucleofección (en torno a 5×10^6 células). Se centrifugaron a 700 rpm durante 5 minutos para obtener un pequeño pellet que se resuspende en 100 μ l del tampón para nucleofección de neuronas de corteza. Una vez resuspendidas las células se les añadió la mezcla de plásmidos a introducir, en nuestro caso, en una proporción de plásmido de interés / GFP-N1 en una relación 1/6 final.

El choque eléctrico que se efectúa para facilitar la entrada de los plásmidos al interior celular dura tan sólo unos segundos tras lo cual las células son sembradas de la manera habitual, en medio de plaqueo neuronal sobre polilisina efectuando un cambio de medio a las 3h. Tanto la actividad luciferasa de los extractos totales como la eficiencia de la nucleofección se analizaron después de 2 días de cultivo.

16. Preparado de proteínas del medio extracelular.

Para la detección de proteínas que son secretadas al medio extracelular realizamos dos tipos de ensayos: liofilización y concentración de la muestra por centrifugación. Antes de cualquiera de estos dos ensayos se centrifugó el medio durante 7 minutos a 1000 rpm para eliminar cualquier tipo de agregado celular o células en suspensión que pudieran influenciar negativamente en el procedimiento.

16.1. Liofilización. Para la liofilización se congeló el medio de cultivo procedente de una placa P60 para posteriormente liofilizar durante una noche (en un vacío generado de 28mT y a -80°C). Después se resuspendió el contenido en H_2O en el volumen adecuado para que el resultado sea el concentrado de las proteínas unas 20 veces. Posteriormente se añadió tampón de carga y se cargó en un gel de acrilamida.

16.2. Concentración de la muestra por centrifugación. El volumen de medio extracelular correspondiente a dos placas P60 en confluencia se cargó en los tubos centrífugo (Centriprep YM-30, Millipore) de un filtro seleccionado según el tamaño de las proteínas que se iban a analizar). Se hizo pasar el medio por los filtros mediante centrifugación a 2200 rpm en un rotor GL4 durante 30 minutos a 4°C . Como resultado de esta centrifugación se obtuvo la muestra en 1ml final a que se añadió tampón de carga y se analizó en geles de acrilamida.

17. Inmunocitoquímica.

Para estudiar la localización de las proteínas de interés por inmunocitoquímica fijamos las células mantenidas a una baja densidad con 4% paraformaldeído durante 20 minutos a temperatura ambiente. Después de tres lavados con PBS1X, las células fijadas se incubaron en 50 mM NH_4Cl para eliminar la posible señal autofluorescente de las mismas. Se bloquearon uniones inespecíficas y se permeabilizó la membrana plasmática de las células durante 30 min con 1% FCS (*fetal calf serum*) o gelatina 0,22%

(*Gelatin from cold water fish skin*, Sigma) y 0.1 % Triton-X-100. Los anticuerpos primarios se incubaron durante 2h a temperatura ambiente y tras los lavados con la solución de bloqueo inicial, de nuevo se incubaron los correspondientes anticuerpos secundarios Alexa fluor-488 (verde) o 594 (rojo) (1:1000, Molecular Probes). Para ver la disposición de actina polimerizada se utilizó Faloidina acoplada a Alexa 488 o 594 (1:100, Molecular Probes).

Los vidrios se montaron sobre Fluoromount G (Southern Biotechnology Associates, Inc) al finalizar las incubaciones y los lavados del anticuerpo secundario. Se tomaron imágenes de cada experimento utilizando un microscopio confocal LSM 510 META (Zeiss) y las imágenes fueron analizadas utilizando el programa LSM Image Browser (Zeiss). Los contajes de longitudes de axón y dendritas se realizaron con la aplicación Neuron J (Image J) así como la medida del área de la región rica en F-actina de los conos de crecimiento (Image J). Los valores estadísticos entre los diferentes grupos de datos se obtuvieron mediante el análisis *Paired-t-test* (programa SigmaPlot) tras contabilizar un mínimo de 100 células por condición a partir de tres experimentos independientes.

NOMBRE OLIGO	SECUENCIA	NOTAS	T _m	TAMAÑO FRAGMENTO
Actina	directo: 5'-TGTTTGAGACCTTCAACACC3', inverso: 5'-TAGGAGCCAGAGCAGTAATC3'	Uso: RT-PCR cuantitativa	66°C 68°C	600 pb
βgalactosidasa	directo: 5'ATCCTCTGCATGGTCAGGTC-3', inverso: 5'-CGTGGCCTGATTCATTCC-3'	Uso: RT-PCR cuantitativa		315 pb
TOPFlash	directo: 5'-GTCGCCCTTTGATCTTACC-3'' Inverso: 5''-GTCGGGTAAGATCAAAGGG-3''	Uso: Retardo en gel (EMSA)	68°C 68°C	Anillamiento de oligos
FOPFlash	directo: 5''-GTCGCCCTTTGGCCTTACC-3'' inverso: 5''-GTCGGGTAAGGCCAAAGGG-3''	Uso: Retardo en gel (EMSA)	72°C 72°C	Anillamiento de oligos
Plásmido Δ56LEF	directo: 5''-GCTTCGTGGGGATCC-3'' inverso: 5''-GTCGCTGTAGGTGATGAG-3'	Úso: RT-PCR	53.3°C 56°C	400 pb
LEF wt	directo: 5''-GACTTAGCCGACATCAAG-3'' inverso: 5''-GTCGCTGTAGGTGATGAG-3''	Úso: RT-PCR	53.7°C 56°C	323 pb
oIMR39 oIMR40	directo: 5''-ATCCTCTGCATGGTCAGGTC-3'' inverso: 5'-CGTGGCCTGATTCATTCC-3	Uso: genotipado, gen LacZ ROSA26	59.4°C 56°C	315 pb
oIMR15 oIMR16	directo: 5''-CAAATGTTGCTTGCTGGTG-3'' inverso: 5''.GTCAGTCGAGTGCACAGTTT-3	Uso: genotipado, control interno	55.3°C 57.3°C	210 pb

Tabla 4. Secuencias de ADN utilizadas para los ensayos de RT-PCR, retardo en gel o genotipado de la colonia de ratones TCF/LEF-LacZ.

RESULTADOS

PRIMERA PARTE:**EXPRESIÓN, LOCALIZACIÓN E IMPLICACIÓN DE LOS RECEPTORES DE ESTRÓGENOS EN EL DESARROLLO DE NEURONAS EN CULTIVO.****1. Expresión de los receptores de estrógenos en neuronas primarias de corteza.**

Si bien se ha descrito la presencia de ER α y ER β en diferentes regiones del cerebro con diferentes niveles de expresión, no hay un estudio detallado de la que tiene lugar en neuronas primarias.

Así, nuestro primer objetivo fue analizar la expresión de los receptores de estrógenos, ER α y ER β en nuestros sistemas de estudio: la línea de neuroblastoma N2a y neuronas primarias de corteza.

Para ello obtuvimos extractos totales a partir de cultivos celulares de la línea N2a procedente de neuroblastoma murino mantenidas durante las 24 horas previas a su recolección en ausencia de suero, y de neuronas primarias mantenidas 3 DIV ambas procedentes de ratón. Analizamos en ellos, mediante WB como se indica en *Materiales y Métodos*, la presencia de dichos receptores de estrógenos.

Los datos indican que ambas isoformas están presentes en N2a y en neuronas primarias procedentes de embriones de 18 días de gestación (Fig.1).

La isoforma ER β se expresa en ambos tipos celulares dando lugar a la banda de proteína correspondiente a su tamaño molecular, de 55KDa aproximadamente (Fig. 1 A).

La forma completa de ER α migra en los geles de acrilamida con la equivalencia de un peso molecular de 66KDa (marcada con flechas en la Fig. 1A). Destacamos que existe una pequeña diferencia entre N2a y Cx en cuanto a la altura a la que migra la banda superior detectada. El anticuerpo que reconoce el extremo C-terminal de ER α reconoce también varios péptidos de un menor peso molecular en todos los tipos celulares testados. Se trata de, mayoritariamente, dos bandas intensas que migran en torno a los 45KDa (señaladas en el WB mostrado en la Fig. 1A con un asterisco). El patrón obtenido difiere ligeramente entre N2a y Cx fundamentalmente en que los extractos totales de células N2a contienen un número mayor de bandas de diferente tamaño entre los 45 y 66KDa (englobadas por la llave en la Fig 1A). Cabe destacar que la intensidad relativa entre las mismas obtenidas es variable también entre muestras de células N2a si bien la intensidad de la que se obtiene en torno a los 45KDa es siempre detectada con una elevada intensidad en la detección por WB.

De la isoforma ER α se han descrito múltiples variantes en células de diferente origen, por ello decidimos hacer un análisis más exhaustivo de los datos obtenidos, utilizando diferentes anticuerpos que reconocen distintas regiones de ER α .

Para estudiar en más detalle cuál es la naturaleza de esos péptidos de menor tamaño, incubamos los extractos totales de N2a, los extractos totales de la línea neuronal NIE-115 y extractos totales de la línea tumoral negativa para la expresión de ER α , MDA-MB-231 que utilizamos como control negativo con un anticuerpo anti-ER α de diferente origen y casa comercial (ver *Materiales y Métodos*).

En N2a y en NIE-115, obtenemos un patrón de bandas similar. Es de destacar la detección de una banda de 45KDa incluso en las células MDA-MB-231 (Fig 1 B).

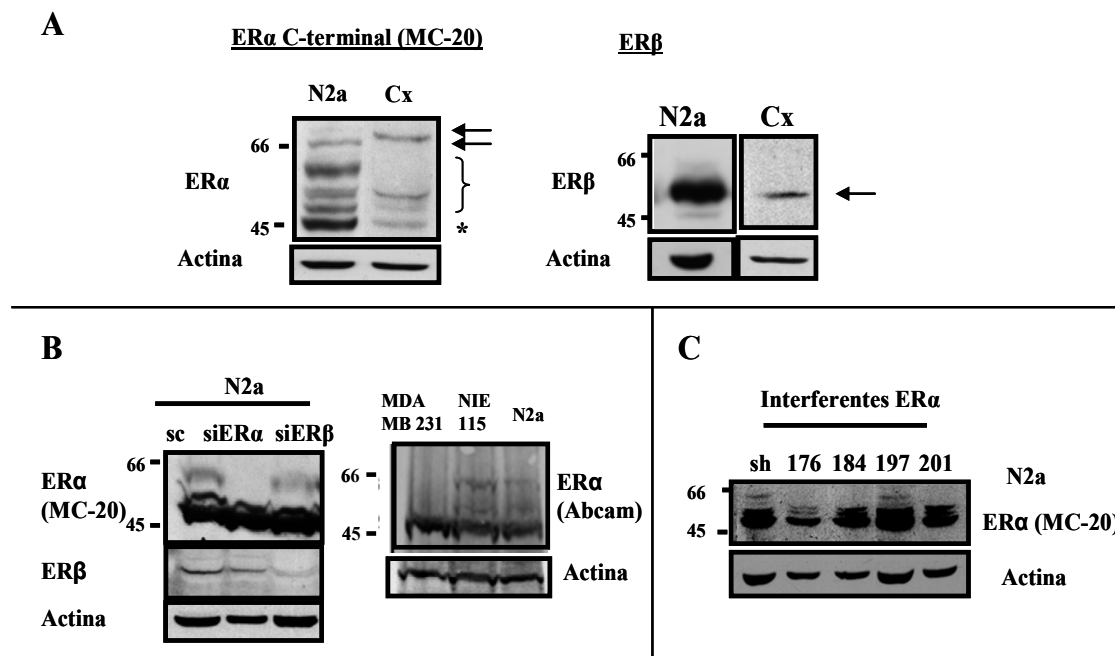


Figura 1. Expresión de los receptores de estrógenos en N2a y neuronas de corteza (3DIV). A). Se recogieron extractos totales de cultivos de la línea N2a mantenida en ausencia de suero y de neuronas primarias de corteza y se analizó la presencia de ER α y ER β . B) Interferencia de ER α y ER β específica en N2a por transducción y comparación del patrón de bandas en extracto total de tras líneas celulares diferentes: MBA-MB-231, NIE-115 y N2a con un anticuerpo de diferente origen (monoclonal, Abcam). En todas ellas se reconoce una banda en 45KDa. C). En células N2a transfectadas con varias construcciones de ARN interferente específicas contra ER α , se analizó el patrón de bandas obtenido con el anticuerpo anti-ER α dirigido contra el extremo C-terminal (policlonal, MC-20). Ninguna secuencia elimina la banda mayoritaria reconocida por el anticuerpo correspondiente a un peso molecular de 45KDa aproximadamente.

Tratamos de comprobar, mediante otro abordaje, si las bandas observadas con la utilización de varios anticuerpos anti-ER α corresponden a alguna modificación, o bien como resultado de un procesamiento proteolítico o bien a alternativas de “splicing” del ARN mensajero de esta isoforma.

Se introdujeron diferentes construcciones de ARN de interferencia para cada isoforma en las células N2a mediante transfección y se analizó los niveles de expresión de cada isoforma de ER una vez transcurridas 72h después de la transfección. Para cada una de las isoformas se comprobó el funcionamiento de cinco construcciones diferentes (detalladas en *Materiales y Métodos*). En el caso de la isoforma ER β se seleccionaron dos de ellas por su alto rendimiento en la disminución de la expresión de la proteína obteniendo con ambas una eficiencia similar en dicha reducción. En la figura 1B se muestra el resultado de la disminución de ER β obtenido con la construcción denominada “150” (ver **tabla 3** de *Materiales y Métodos*).

Cuando se introdujeron las construcciones de ARN interferente específicas de ER α y se analizaron los extractos totales celulares por inmunotransferencia utilizando el anticuerpo anti-ER α dirigido contra el extremo C-terminal, obtuvimos resultados diversos en función de la construcción utilizada aunque en ningún caso se redujo la cantidad expresada de las bandas obtenidas en 45 KDa (Fig 1 C). Las construcciones de los interferentes denominadas “176” y “201” son con las que obtenemos una mayor reducción de ER α (66KDa) y, como vemos, sólo el interferente “176” reduce significativamente las dos bandas situadas por debajo de la banda de 66KDa.

Concluimos de esta forma que mientras la isoforma ER β se encuentra presente en sólo una forma de expresión en células neuronales, ER α presenta principalmente dos variantes de expresión o de modificación post-traducciona. Del análisis de las bandas obtenidas con el anticuerpo anti-ER α (Ct, MC-20) identificamos como “genuinas” de ER α a las que corresponden a 66KDa y dos péptidos de menor tamaño. Sin embargo, la banda intensa que se detecta en torno a los 45KDa con varios de los anticuerpos utilizados parece ser una detección inespecífica.

2. Localización de los receptores de estrógenos en neuronas de corteza e hipocampo.

El estudio de la localización de los receptores de estrógenos en las neuronas se realizó a lo largo de su desarrollo en cultivo desde el primer día del mismo hasta el día 7 *in vitro* mediante tinción por inmunocitoquímica.

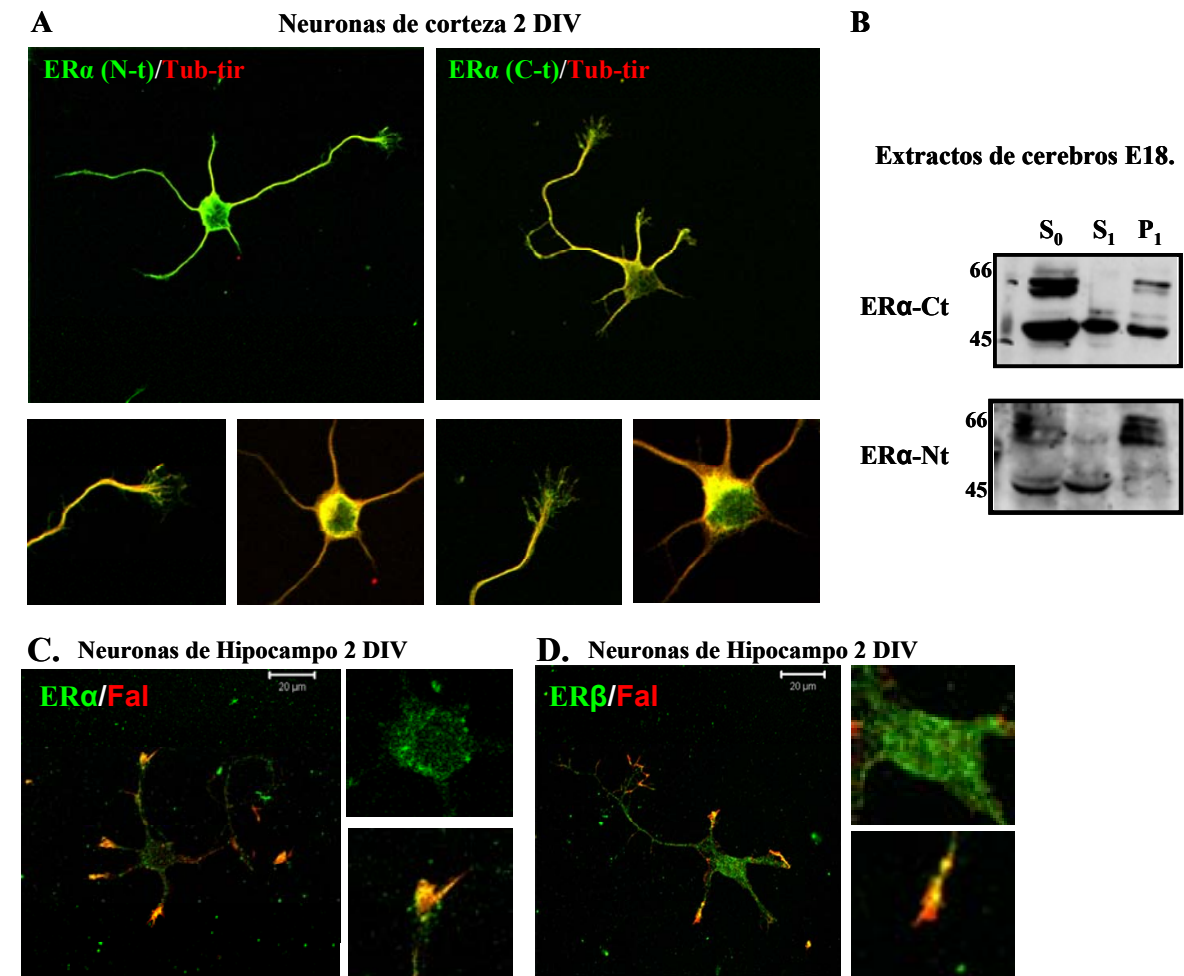


Figura 2. A) Localización de ERα en neuronas de corteza de 2DIV. Las neuronas se mantuvieron 2 DIV y se fijaron para su marcaje con dos anticuerpos específicos para ERα (verde) que se utilizaron en combinación con un anticuerpo anti-tyr-tubulina (rojo). Se muestran ampliaciones de conos de crecimiento y núcleo que detallan su localización. **B) Asociación de ERα a microtúbulos de primer ciclo obtenidos de extracto de cerebro embrionario de ratón.** S₀: soluble total, S₁: sobrenadante tras polimerización, P₁: pellet de microtúbulos de primer ciclo. Detectamos la presencia de ERα (bandas de 66 KDa) enriquecida en la fracción que contiene tubulina polimerizada. **C) Localización de ERα y ERβ en neuronas de hipocampo de 2 DIV.** La tinción se realizó utilizando los anticuerpos anti-ER α (monoclonal, Abcam) o β (policlonal, Abcam) (verde) en combinación con Faloidina (rojo). Observamos ambas isoformas a lo largo de la neurona y enriquecidas especialmente en los extremos de las neuritas. Se muestran ampliaciones de núcleo y conos de crecimiento en donde en sección confocal co-localizan con F-actina. Barra: 20 μm.

Comprobamos en primer lugar la localización de ERα en neuronas primarias de corteza de 2 DIV utilizando dos de los anticuerpos descritos en *Materiales y Métodos* anteriormente (Fig 2 A). Ambos detectan inmunoreactividad de ERα en el núcleo (ver ampliación del corte confocal). Además el marcaje obtenido se encuentra distribuido a lo largo de las neuritas detectándose también en los conos de crecimiento.

En las imágenes obtenidas es clara la distribución similar del receptor de estrógenos con tubulina tirosinada (Fig. 2A), comprobamos varios anticuerpos específicos de ER α . Esto nos hizo pensar en una posible asociación del receptor de estrógenos con los microtúbulos.

Para determinar si ER α se asocia ya sea directa o indirectamente a través de otras proteínas, a los microtúbulos realizamos ensayos de polimerización y despolimerización de tubulina a partir de extractos de cerebro embrionario E18 (*ver Materiales y Métodos*).

Las fracciones obtenidas correspondientes al soluble total (S0), sobrenadante tras la polimerización (S1) y el pellet de polimerización de primer ciclo enriquecido en microtúbulos (P1) se analizaron mediante inmunotransferencia (*Western blot*, WB) utilizando dos anticuerpos específicos de ER α dirigido uno contra el extremo C-terminal y el otro contra el N-terminal de la proteína (Fig 2B). Con estos ensayos observamos un enriquecimiento de ER α (66KDa) en la fracción rica en tubulina polimerizada acompañado con una pérdida en la fracción soluble (S1). La asociación de ER α a estas estructuras permite entablar una asociación directa o indirecta, a través de otras proteínas de ER α con componentes del citoesqueleto. Sin embargo, en el pellet (P1) observamos también la detección de la banda obtenida anteriormente de 45KDa de peso molecular y que hemos clasificado como inespecífica. Su abundancia relativa es mayor que la que obtenemos de los extractos totales de corteza posiblemente debido a la utilización de extracto total homogenizado de cerebro embrionario para la polimerización de tubulina. La utilización del anticuerpo dirigido contra el extremo N-terminal permite enriquecer en términos relativos la intensidad de las bandas situadas en torno a 66 KDa respecto a la obtenida en 45KDa.

Analizamos de la misma manera la expresión de ER α utilizando un anticuerpo monoclonal en este caso (Fig. 2C) y ER β (Fig. 2D) en neuronas de hipocampo de 2 DIV en las que detectamos un enriquecimiento similar de las dos isoformas en los extremos en crecimiento de las neuritas. Mediante microscopía confocal se analizó la distribución de las isoformas en combinación con el marcador de actina polimerizada, Faloidina.

Los datos del análisis de las inmunofluorescencias indican que tanto ER α como ER β parecen compartir localización con regiones ricas en F-actina en los conos de crecimiento, si bien los ERs quedarían en la región más proximal de este subcompartimento.

3. Análisis de la función de los receptores de estrógenos en el desarrollo neuronal.

Puesto que ER α y ER β se encuentran acumulados especialmente en zonas de crecimiento de las neuritas, y que ER α parece estar asociado al citoesqueleto en un primer momento del desarrollo, quisimos estudiar la posible implicación de los estrógenos en el crecimiento

dendrítico y axonal de neuronas de corteza e hipocampo en sus primeras fases de la diferenciación neuronal.

Para poder analizar la función de los receptores de estrógenos nos planteamos principalmente tres tipos de abordaje:

- Primero, estudiamos el efecto de la **adición de estradiol** en los cultivos neuronales.
- Segundo, realizamos un **bloqueo de los receptores** utilizando un compuesto (ICI 182,780) con alta afinidad de unión al dominio de unión al ligando de ER α y ER β .

En ambos casos, el tratamiento se realizó desde el momento de adhesión de las neuronas y se mantuvo, añadiendo una dosis diaria, hasta el momento del análisis.

- Y tercero, llevamos a cabo la **supresión de manera específica de cada isoforma del receptor** de estrógenos utilizando ARN de interferencia que disminuye la expresión de ER α o la de ER β . Esta aproximación nos permite discernir si existen diferencias en la implicación de cada isoforma de los receptores de estrógenos en esta función.

En cada una de las aproximaciones, se mantuvieron las neuronas de 3 a 7 días con los tratamientos indicados en cada caso, se fijaron y marcaron con anticuerpos anti-tubulina o con el compuesto Faloidina-TRITC, que se asocia con alta afinidad a actina polimerizada, para observar la morfología general. Para la cuantificación de la longitud axonal se utilizaron marcadores específicos de este compartimento, SMI31 (anticuerpo específico para las formas fosforiladas de MAP1B y NF-H) o tau-1 (que reconoce a la proteína tau defosforilada), como se indica en cada caso. Se observaron las extensiones neuríticas y se consideró “axón” a las prolongaciones marcadas con los anticuerpos específicos de este compartimento y cuya longitud superaba las 50 μ m (Goslin and Banker 1989).

3.1. Tratamientos de Estradiol e ICI 182,780.

El bloqueo de los receptores de estrógenos impide el correcto desarrollo de las neuronas en cultivo.

Realizamos tratamientos de estradiol (E₂) a una concentración final de 50nM y en paralelo tratamientos con ICI 182,780 utilizado a 5 μ M. Las neuronas tratadas se fijaron o bien a los 3 DIV o a los 7 DIV para analizar su morfología.

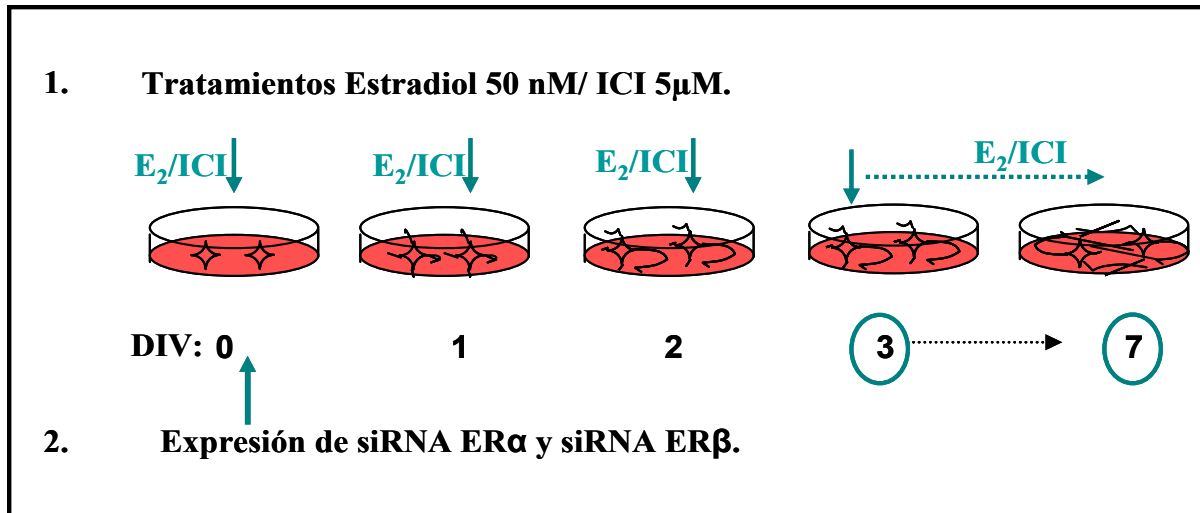


Figura 3. Esquema de los abordajes utilizados para el análisis del papel de ERs en la morfología neuronal. Las neuronas se mantuvieron entre 3 y 7 DIV. **1.** Los tratamientos con estradiol o ICI se realizaron diariamente a las concentraciones indicadas. **2.** Para la reducción de los niveles de cada isoforma se utilizaron las construcciones que contienen los interferentes (ver *Materiales y Métodos*) introduciéndolas en las neuronas por electroporación en momentos previos al plaqueo. Como método alternativo de uso, las construcciones de interferentes se empaquetaron en plásmidos lentivirales para la infección de neuronas transcurridas 30 horas de la adhesión como se especifica en *Materiales y Métodos*

Con la aplicación diaria de estradiol se observa un aumento en la longitud axonal respecto a las neuronas control [Longitud media axonal, μm +desviación estándar: C ($247,57 \pm 12$), E ($370,27 \pm 20$)] como se muestra en la gráfica de la Fig.4 en neuronas de 3 DIV.

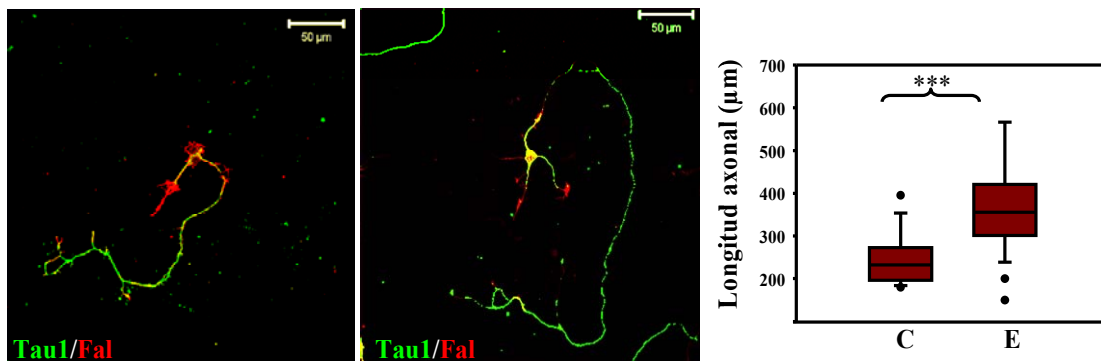


Figura 4. El estradiol incrementa la longitud axonal en neuronas de hipocampo de 3DIV. Las neuronas fueron tratadas con estradiol 50 nM durante 3 días y fijadas posteriormente para su análisis. La longitud axonal fue contabilizada tras la tinción de las células con el marcador axonal Tau1 y con Faloidina. La gráfica muestra los datos numéricos obtenidos de tres repeticiones independientes con $n=100$ neuronas contabilizadas en cada repetición. Se muestra el valor estadístico entre los dos grupos. *** $p \leq 0,001$

Las neuronas requieren para su mantenimiento el aporte de factores neurotróficos en el medio de cultivo. Dado que el suplemento utilizado en el cultivo, B27 en cuya composición se encuentran entre otros compuestos estrogénicas, nos planteamos la duda de si el aporte extra

de estradiol mostraría resultados atenuados debido al nivel basal de estrógenos en el que se encuentran desde el inicio las neuronas *in vitro*.

Para comprobar si el efecto sobre la longitud axonal observado con el tratamiento de estradiol es debido a la activación de ERs comprobamos qué supone el bloqueo de los receptores de estrógenos en la morfología neuronal respecto a la situación control. Para ello utilizamos el compuesto antagonista ICI 182,780.

La concentración de ICI 182,780 se determinó en base a su capacidad bloqueante de los receptores, este compuesto es utilizado habitualmente a una concentración 100 veces mayor que el estradiol. Por ello, mantenemos dicha relación entre la concentración de estradiol añadido y el compuesto ICI 182,780, en todos los experimentos realizados, que se fijaron en 50 nM para el estradiol y 5 μ M para el ICI.

Lo primero que comprobamos fue si existe pérdida de neuronas durante el tratamiento con el antagonista, contabilizamos para ello los cuerpos neuronales adheridos en la situación control respecto a ICI a los 3 y a los 7 días del cultivo.

El número de neuronas tras siete días del tratamiento con ICI supone sólo la pérdida en algunos casos del 10% del total de ellas, diferencia que no es estadísticamente significativa. Por tanto, el compuesto ICI 182,780 no parece afectar a la viabilidad neuronal (Fig 5 C). Sin embargo, cuando contabilizamos el número de neuronas que presentan axón a 3 días de cultivo es menor que en el control (40% del total), en donde un 80% de las neuronas presentan un axón determinado por el marcaje diferencial con el anticuerpo SMI-31. A pesar de esta diferencia inicial, que indica un retraso en la diferenciación neuronal con el tratamiento de ICI a los 7 DIV el 100% de las neuronas restantes presentan axón diferenciado (Fig. 5 C).

Una vez comprobado que el bloqueo de los receptores de estrógenos no afecta sustancialmente a la viabilidad neuronal, nos detuvimos en la observación de la morfología que adquieren las neuronas en sus primeros estadios cuando se desarrollan en presencia de este compuesto.

Los datos obtenidos con la adición de ICI la complejidad de las ramificaciones es mucho menor en el caso de las neuronas tratadas con ICI 182,780, observándose también un claro efecto en la longitud axonal (Fig. 5 A).

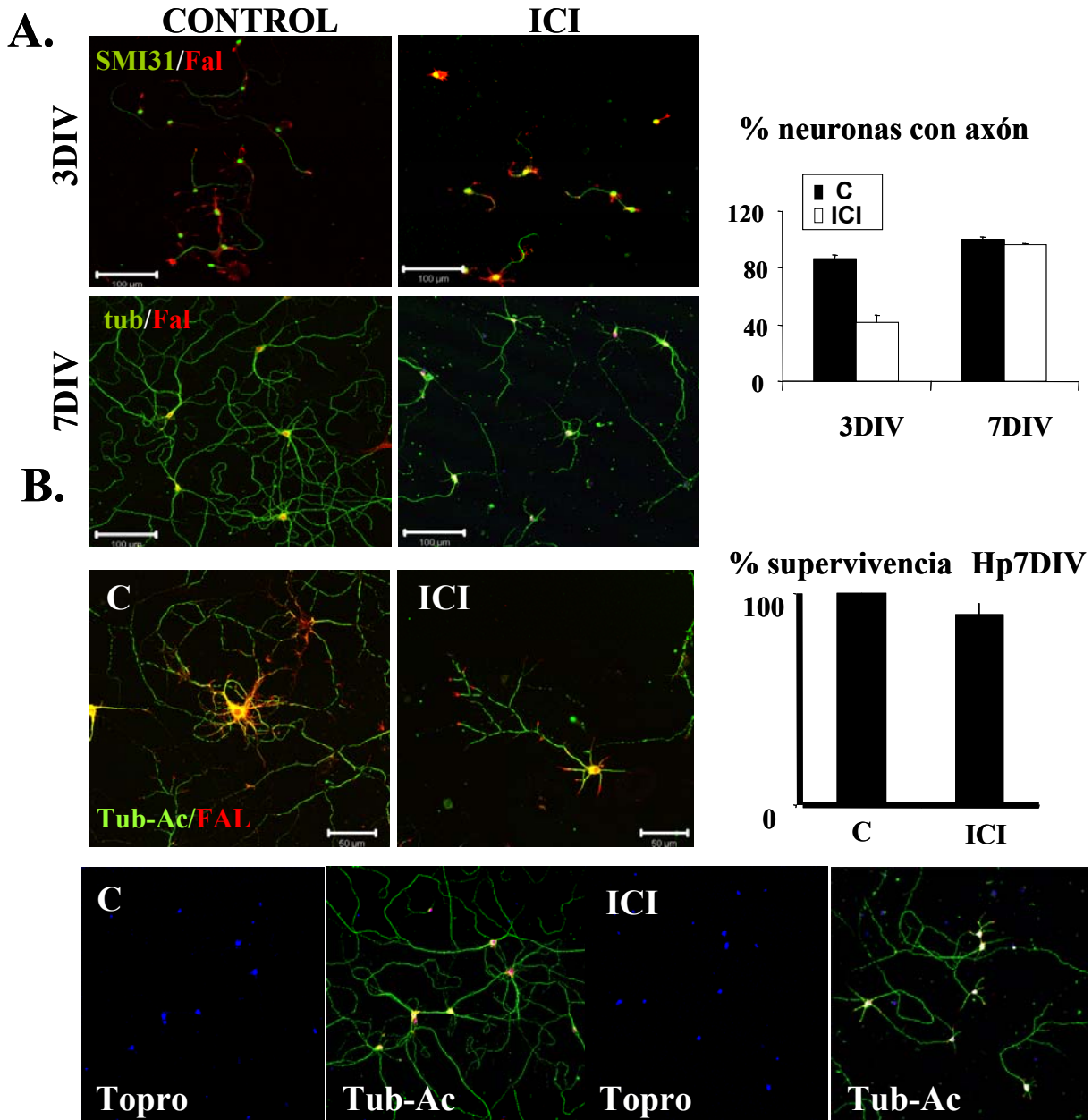


Figura 5. Efecto de ICI 182,780 sobre las neuronas de hipocampo. Se mantuvieron las neuronas de hipocampo durante 7 días *in vitro* con un tratamiento diario de ICI 5 μ M o el mismo volumen de su vehículo (DMSO). Se fijaron transcurrido ese tiempo y se analizó su morfología mediante inmunocitoquímica. **A.** La progresión de las neuronas tratadas con ICI 182,780 se encuentra ralentizada respecto al control. Las neuronas tratadas con ICI 182,780 muestran retraso en su desarrollo a los 3 días, en el que se encuentran en estadio 1-2, y a los 7 días, en el que permanecen en estadio 2. En la gráfica se representa el número de neuronas que presentan axón (marcado con SMI31, verde) tras los tratamientos desde el inicio del cultivo. Los datos proceden de n=3 experimentos independientes y 100 células contabilizadas por experimento. Se realizaron los marcajes con Faloidina en rojo y tubulina en verde. La barra representa 100 μ m. **B).** Se muestra la tinción realizada con TO-PRO para contabilizar el número de núcleos presentes en las condiciones control e ICI. Se contabilizó una pérdida del 10% a los 7 días del cultivo a partir de n=3 experimentos independientes y 20 campos contabilizados por experimento. Barra: 50 μ m.

Uno de los efectos claros observado con la adición de ICI es la disminución de la longitud axonal. Tras analizar las neuronas tratadas con este compuesto se fijaron y tiñeron con un marcador axonal (SMI-31) para determinar las características morfológicas, en concreto longitud axonal y dendrítica (determinada por la ausencia de marcaje con SMI-31).

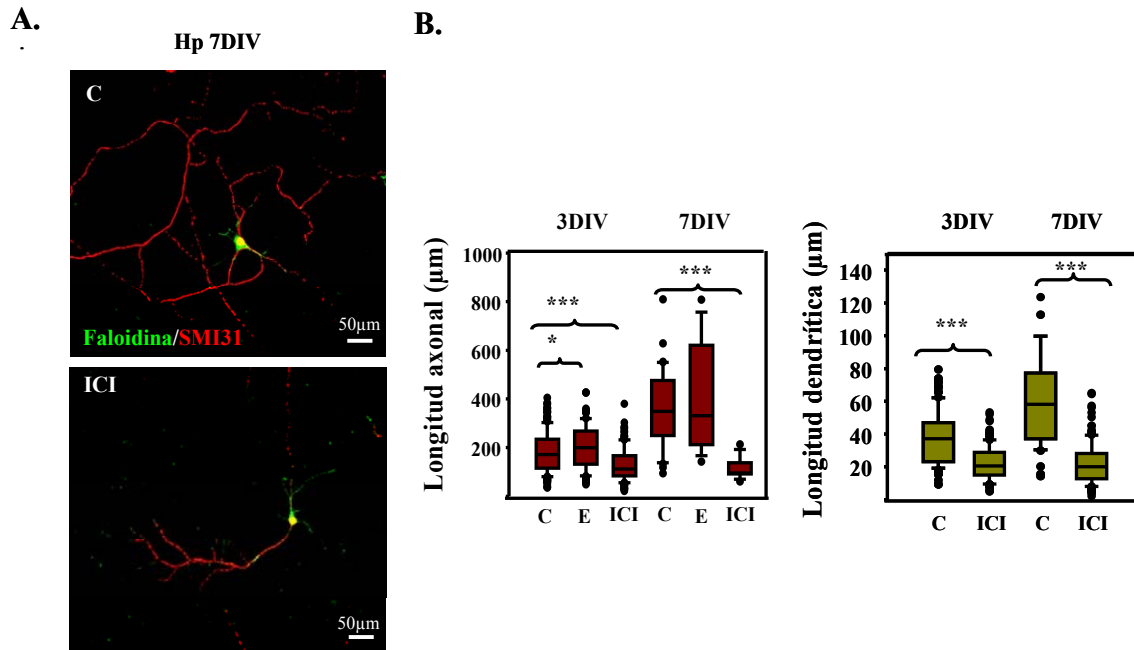


Figura 7. El tratamiento de ICI en las neuronas de hipocampo reduce la longitud axonal. Las neuronas de hipocampo se trataron diariamente con ICI 5 μ M o estradiol 50 nM, y se fijaron a los 3 y a los 7 días del cultivo. Las muestras se tiñeron con un marcador del axón (SMI-31, en rojo) y Faloidina (actina polimerizada, en verde). Se realizaron contajes de la longitud axonal de $n=3$ experimentos independientes y de 100 neuronas por experimento utilizando la aplicación *NeuronJ*. La adición de estradiol genera un ligero aunque significativo aumento, mientras que ICI reduce muy significativamente la longitud paralizando el desarrollo del axón desde los 3 días en una longitud media de 150 μ M en comparación con 400 μ M en los controles. Se muestra el valor estadístico entre los grupos según se indica con las llaves: * $p \leq 0,05$, *** $p \leq 0,001$. Barra: 50 μ m.

La contabilidad muestran cómo la longitud axonal se ve ligeramente incrementada en las neuronas tratadas con estradiol respecto al control [Longitud media axonal + desviación estándar: C: $170 \pm 5,4$ μ m frente a E: $199,61 \pm 8,9$ μ m], y lo que es más significativo es el hecho de que las neuronas se ven visiblemente afectadas con la adición de ICI en lo que respecta a longitud axonal [ICI: $112,31 \pm 5,2$ μ m frente a ICI+E: $114,4 \pm 5,6$ μ m]; y desarrollo dendrítico [Longitud media dendrítica + desviación estándar: C: $30,52 \pm 1,02$ μ m vs ICI: $20,48 \pm 1,4$ μ m]. Esta diferencia se aprecia ya a los 3 días del cultivo de las neuronas y se hace claramente notable cuando las neuronas se mantienen durante 7 días en cultivo. En la figura 7, se representa la longitud axonal y la longitud de las dendritas de neuronas de hipocampo tratadas o no con el antagonista de los receptores en los días 3 y 7 del desarrollo *in vitro*. Las diferencias tanto en longitud axonal [Longitud media axonal + desviación estándar: a 7DIV- C: $349,14 \pm 20$ μ m, E: $372,91 \pm 30$ μ m frente a ICI: $98,52 \pm 11$ μ m] como en

longitud dendrítica media [C ($60,35 \pm 5,19$); **ICI** ($20,59 \pm 1,47$)] son claras tras 7 días de cultivo.

Con el fin de analizar si el tratamiento es reversible tras un tratamiento de ICI 182,780 de 12 horas, se cambió el medio de cultivo y se permitió que las neuronas se desarrollaran en medio fresco otros 2 días más. Este experimento, del que se muestran brevemente los datos numéricos correspondiente al análisis del lavado de ICI muestra la posibilidad de que las neuronas se desarrollen una vez eliminado del medio de cultivo [Longitud media axonal, +desviación estándar: **2DIV ICI** ($59 \pm 5,99$); **2DIV ICI 12h + lavado** ($106,56 \pm 6,59$)]. La reversión de la longitud axonal tras el lavado de ICI muestra un valor estadístico significativo *** $p \leq 0,001$.

Efecto del antagonista de ERs en la maduración de axonogénesis.

Como último dato referente al desarrollo neuronal en presencia de ICI 182,780 decidimos estudiar si en dichas neuronas se daba la correcta aparición del segmento inicial del axón. Este compartimento supone de un gran interés en cuanto a su implicación en la transmisión del impulso eléctrico en neuronas ya adultas (Garrido et al. 2003; Palay et al. 1968). Su distinción por una composición proteínica específica en cultivo tiene lugar a partir de los 3 DIV y continúa madurando hasta que es funcionalmente activo en neuronas mantenidas durante 7-14 DIV. Para el marcaje del segmento inicial del axón se utilizó un anticuerpo específico para la proteína Ikb α fosforilada (Sanchez-Ponce et al. 2008).

Observamos la presencia de este compartimento en neuronas control y tratadas, sin observar ninguna diferencia en el momento de aparición entre ellas. Así pues, la maduración del axón no se encuentra modificada por el bloqueo de ER α y ER β (Fig. 6) aunque se trate de axones de menor longitud.

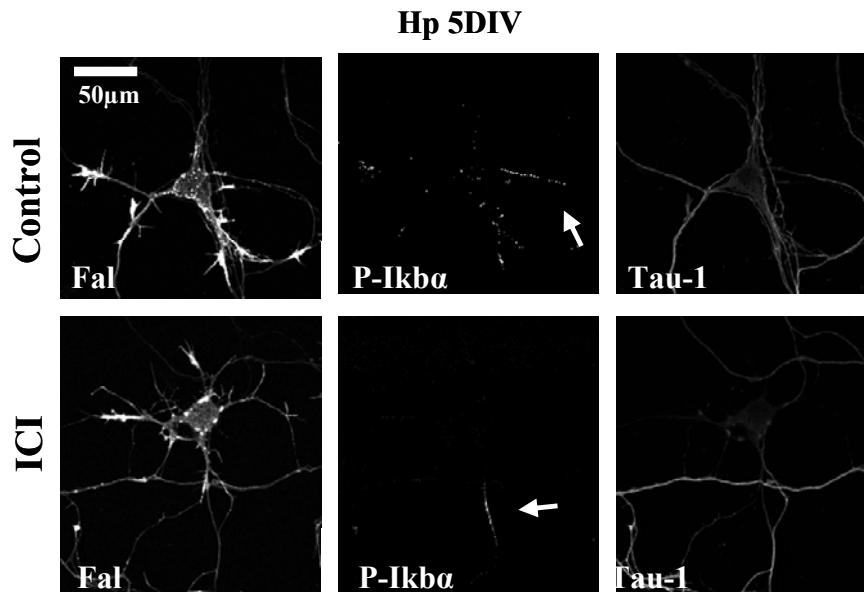


Figura 6. ICI no impide la formación del segmento inicial del axón en neuronas de hipocampo de 5DIV. Para marcar el segmento inicial del axón, se utilizó un anticuerpo anti-P-Ikba, proteína que se acumula en este compartimento neuronal. Se combinó dicho marcaje con el anticuerpo tau-1, marcador axonal, y con Faloidina. No existen diferencias entre ambas condiciones (control, panel superior; ICI, panel inferior). N=2 experimentos independientes. La barra representa: 50µm.

El compuesto ICI 182,780 tiene una afinidad similar por el dominio de unión a ligando de los receptores de estrógenos ER α y ER β (Leblanc et al. 2007). El efecto en la morfología obtenido con este compuesto podría deberse o al bloqueo de ER α , al de ER β o al bloqueo conjunto de estas isoformas.

3.2. Tanto ER α como ER β están implicados en la elongación de neuritas en los primeros estadios del desarrollo neuronal.

Para determinar si en el efecto sobre el desarrollo neuronal de los receptores de estrógenos predomina la participación de una de las isoformas o por el contrario sus funciones son equivalentes en este efecto, recurrimos a una aproximación distinta consistente en la disminución de la expresión de cada una de las isoformas. De este modo, una vez comprobada la eficiencia de la interferencia de ER α y ER β (Fig. 1 B) electroporamos neuronas de hipocampo para introducir dichas construcciones antes del plaqueo de las células como se detalla en *Materiales y Métodos*.

Para determinar el efecto de la disminución de la expresión en el desarrollo axonal, se electroporaron las neuronas con una combinación de las construcciones interferentes y el plásmido de expresión de la proteína fluorescente GFP, en una proporción de 1:6 de manera

que, estadísticamente, aquellas neuronas que expresan GFP (verdes) contienen en una altísima proporción en su interior ambas construcciones. Las neuronas en las cuales se introdujeron los interferentes correspondientes a cada isoforma de receptor de estrógenos, o expresando una secuencia interferente aleatoria (sc “*scrambled*”, control interno) fueron mantenidas hasta 7 días en cultivo. La determinación de la longitud axonal se realizó sobre las neuronas que mostraban expresión de GFP y que se habían co-electroporado con ARN de interferencia de secuencia aleatoria (sc), o con ARN de interferencia ER α (“201”), o con o ARN de interferencia ER β (“150”) (Figura 8 A). Utilizamos el marcaje con el anticuerpo tau-1 para identificar los axones y llevar a cabo su medición. Los datos obtenidos con dichos contajes se muestran en la figura 8 B.

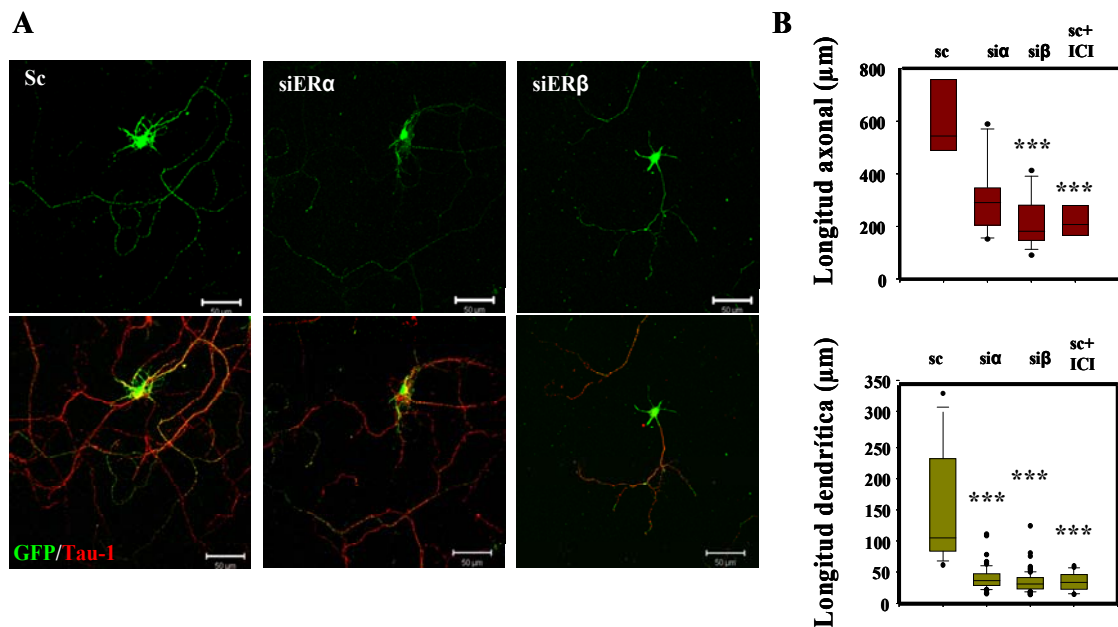


Figura 8. Efecto de la supresión de cada isoforma de receptor de estrógenos, α y β , en neuronas de hipocampo (7DIV). A). Se utilizaron dos técnicas de manera independiente para introducir las construcciones de los ARN interferentes en las neuronas: electroporación. En ambos casos, se combinó la construcción interferente con un plásmido de expresión de la proteína verde fluorescente (GFP) (ver *Materiales y Métodos*). Las neuronas se fijaron a los 7 días del cultivo y se analizaron por inmunocitoquímica utilizando anticuerpos específicos para GFP y para tau-1 (marcador axonal). **B)** En las gráficas se representan las longitudes de las dendritas o los axones expresadas en μm de las neuronas que expresan GFP. Datos proceden de $n=3$ experimentos independientes, 100 neuronas contabilizadas por experimento. Se muestra el valor estadístico de cada grupo respecto al control (sc): *** $p \leq 0,001$. Barra: $50\mu\text{m}$

La comparación de estas tres situaciones muestra cómo la supresión de tanto ER α como ER β modifica la morfología neuronal, observándose una ligera disminución en la longitud axonal a día 3 de cultivo [Longitud media de axón+desviación estándar: **sc**: $180 \pm 10 \mu\text{m}$ frente a **siER α** : $145,4 \pm 11,9 \mu\text{m}$ y **siER β** : $135,3 \pm 10 \mu\text{m}$ o a **ICI**: $101,6 \pm 11 \mu\text{m}$] que se hace más

notable a los 7 días [Longitud media axonal +desviación estándar: sc: 759,02± 50 µm frente a **siERα:** 363,82± 39 µm y **siERβ:** 192,11± 20 µm o **ICI:** 263,2± 27 µm].

La interferencia de la expresión de ERβ da lugar a una morfología neuronal similar al obtenido con la adición de ICI a 3 DIV. Sin embargo, a 7 DIV, cuando las dendritas han comenzado su desarrollo la interferencia tanto de ERα como de ERβ genera una disminución clara en la longitud de las mismas [Longitud media de dendritas, µm+desviación estándar: sc: 192,47± 23 µm frente a **siα:** 36,99± 2,5 µm, **siβ:** 31,11± 1,6 µm o **ICI:** 36,19± 3 µm].

Los datos obtenidos en esta primera sección de resultados muestran la posibilidad de conseguir una reducción en la longitud axonal o bien con el bloqueo de los receptores de estrógenos o bien con la reducción de ERα o en mayor medida, de ERβ desde las primeras fases del desarrollo axonal.

SEGUNDA PARTE:**SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR MEDIADA POR ESTRADIOL.**

En esta segunda parte estudiaremos qué vías de señalización son iniciadas, de forma rápida, por la adición de estradiol cuando interacciona con los receptores de estrógenos α y β . Estudios previos del laboratorio habían determinado la interacción de ER α con la vía de señalización de insulina/IGF-1 en neuronas, que da lugar a la activación de PI3K-Akt (Cardona-Gomez et al. 2004).

Esta sección se divide en dos grandes vías que podrían activarse en respuesta a estrógenos. En primer lugar estudiamos la activación de Akt y su efecto sobre dos de sus dianas: mTORC1 y GSK3, y por otro analizaremos la posible activación de la ruta de las MAPK por estradiol.

4. Activación de la vía PI3K-Akt por estradiol en neuronas de hipocampo.

En trabajos anteriores, se describió que la adición de 17- β estradiol es capaz de modificar la activación de varias de las proteínas que constituyen la vía de PI3K (Cardona-Gomez et al. 2004). La fosforilación de Akt por estrógenos ha sido objeto de estudio en trabajos recientes en los que se demuestra cómo ER α interacciona físicamente con la subunidad p85 de la enzima PI3K, principal modulador de la fosforilación en Thr³⁰⁸-Akt, aumentando su actividad quinasa en neuronas. En estos trabajos se observaba una posterior disminución de la actividad de GSK3 y la variación en alguno de sus sustratos como consecuencia de la disminución de su actividad quinasa.

Con el objetivo de estudiar los cambios en la actividad de Akt con la adición de estradiol, comprobamos su estado de fosforilación a lo largo del proceso de maduración axonal en neuronas de corteza e hipocampo a los 3 días del cultivo con el tratamiento de estradiol y también en presencia del antagonista de los receptores de estrógenos ICI 182,780.

Así, analizando mediante WB los extractos totales obtenidos de las neuronas tratadas pudimos comprobar que la adición de estradiol proporciona un incremento en los residuos de Akt que dan cuenta de su activación (Thr³⁰⁸, Ser⁴⁷³) en neuronas de hipocampo mantenidas 3 días en cultivo en presencia de estradiol 50 nM. La activación de Akt que tiene lugar en respuesta a la presencia de estradiol es bloqueada con la adición al medio de cultivo del antagonista de los receptores de estrógenos ICI. Sin embargo, con la adición de ICI sólo podemos reducir la

fosforilación en el residuo de Thr³⁰⁸, manteniéndose en presencia del antagonista de ERs la fosforilación en Ser⁴⁷³ (Fig.9).

A partir de esta kinasa, Akt, pretendemos estudiar dos grandes vías de señalización que han sido ampliamente descritas en muchos sistemas celulares, la señalización mediada por GSK3 y la que da lugar a la estimulación de la ruta Rheb/ mTORC1.

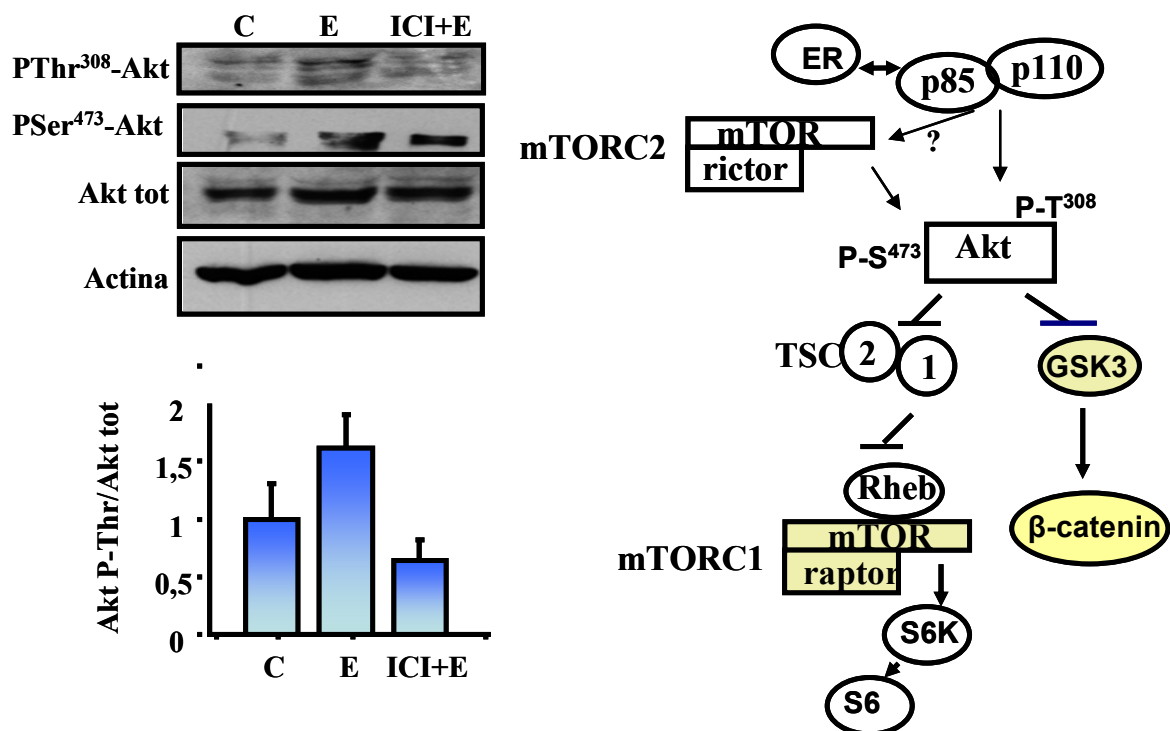


Figura 9. Activación de Akt a través de los receptores de estrógenos en neuronas de hipocampo (3DIV). Se mantuvieron las neuronas durante 3 días en cultivo con la adición cada 24 horas de estradiol (50nM) o junto con ICI 182,780 (5μM) y se recogieron los extractos totales para analizar mediante *western blot*. Datos procedentes de n=3 experimentos independientes. Como se muestra en el panel, la adición de estradiol aumenta la fosforilación de los dos residuos de activación de Akt (Ser⁴⁷³ y Thr³⁰⁸). En el esquema de la figura se representan algunas de las dianas de Akt que han sido estudiadas en este trabajo (color amarillo).

5. Estradiol promueve la activación de mTORC1.

Una de las proteínas fosforiladas por Akt es proteína TSC2, dando lugar así a la activación de Rheb y el complejo mTORC1 (Inoki et al. 2002; Manning et al. 2002; Potter et al. 2002).

Así, a continuación intentamos comprobar si la activación de Akt a través de estradiol podría afectar a esta ruta. Estudiamos como una primera aproximación si estradiol modifica la actividad del complejo mTORC1.

Para comprobar la posible activación de mTORC1 por estradiol decidimos comprobar el estado de uno de sus sustratos, la proteína S6K. Una forma para determinar la actividad

quinasa de S6K1 es analizar el estado de la fosforilación de la proteína ribosomal S6, que en último término sería un indicador indirecto de la actividad del complejo mTORC1 (esquema de la figura 9). Cuando analizamos la fosforilación de S6 vemos cómo estradiol induce un ligero aumento tanto a los 3 días del cultivo como a los 7, mientras que la cantidad total de S6 y de S6K total permanecen invariables entre el control y los tratamientos (Fig. 10 A). Más notable es la inhibición en la fosforilación de S6 cuando las neuronas son tratadas con ICI 182,780. Este resultado indica que estradiol activa S6K en neuronas de hipocampo y que es posible bloquear esta activación con el antagonista de los receptores de estrógenos.

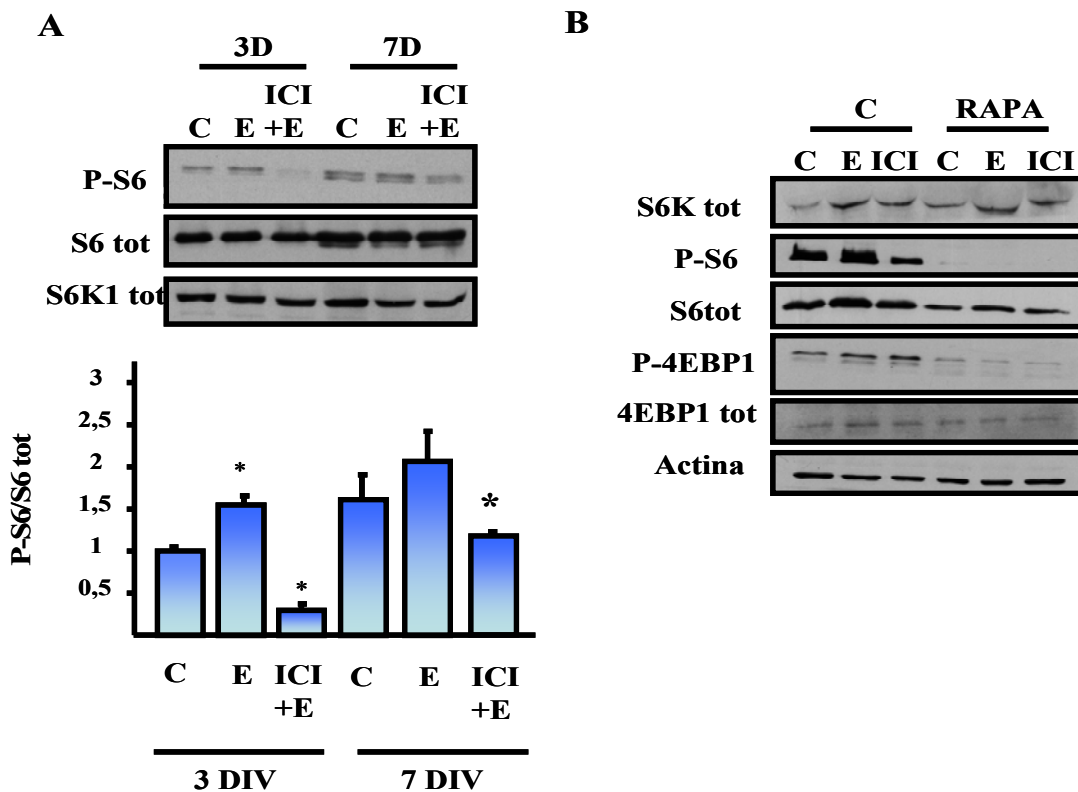


Figura 10. Activación de S6K dependiente de la actividad de mTORC1 por estradiol en neuronas de hipocampo. A) Se mantuvieron las neuronas de hipocampo en cultivo durante 3 DIV o 7DIV y se trataron con estradiol 50 nM, ICI 5 μ M. Se obtuvieron los extractos totales de las neuronas para analizar mediante western blot el estado de fosforilación de la proteína S6 utilizando un anticuerpo que reconoce la fosforilación en los residuos de S6K. B) El aumento de actividad de S6K inducido por estradiol es dependiente de la actividad de mTORC1. Las neuronas de 3DIV se trataron con estradiol 50 nM, ICI 5 μ M sólo o en combinación con rapamicina 20 nM. Se analizaron varias dianas de la ruta de activación como S6 o el factor 4EBP1. Actina se utilizó como control de normalización. Los datos proceden de n=3 experimentos independientes. El valor estadístico está referido en cada caso a su control no-tratado correspondiente al mismo tiempo de cultivo. *p \leq 0,05.

Aunque la forma mayoritaria de activación de S6K en muchos tipos celulares es mediante la actividad de mTORC1 de manera directa (Kim et al. 2002), existen otras vías de activación de S6K como por ejemplo la vía de MAPK o complementarias como la fosforilación de S6K por PDKs de forma directa o a través de PKC atípica. Para comprobar si en neuronas la actividad

de S6K, observada a través de la fosforilación de S6, ocurre a través de mTORC1 o es dependiente también de otras vías, decidimos inhibir mTORC1 y analizar el efecto de esta inhibición sobre la proteína S6. Tratando neuronas de hipocampo de 3 días en cultivo con rapamicina, comprobamos en el extracto celular obtenido y analizado por *western blot* que el bloqueo de la activación de mTORC1 es suficiente para suprimir fuertemente la fosforilación de S6. Es decir, podemos considerar al complejo mTORC1 como la principal fuente de fosforilación en nuestro sistema de estudio de S6K.

Como se observa, el tratamiento de estradiol 50nM en cultivos neuronales induce un ligero aumento en la fosforilación de S6 que queda bloqueado con la adición de ICI. La adición de rapamicina genera ausencia total de la fosforilación de S6 con el tratamiento de estradiol (Fig. 10 B). En la figura se muestra también el efecto de estradiol y rapamicina sobre los niveles de otro de los sustratos de mTORC1, la proteína 4EBP1 cuya fosforilación por mTORC1 resulta inhibitoria para su función, resultando dicha inhibición en un efecto positivo sobre la síntesis de proteína finalmente. Dicha fosforilación de 4EBP1, presenta poca variación con la presencia de estradiol o ICI pero que sí se modula como era de preveer con la adición de rapamicina.

Los datos obtenidos con el tratamiento de estradiol, con el bloqueo de los receptores de estrógenos y la inhibición de mTORC1 con rapamicina junto con los tratamientos indicados, nos sugiere una posible activación de mTORC1 y S6K por estradiol a través de sus receptores. Decidimos comprobar cuál puede ser la relevancia de esta regulación por estradiol en la morfología neuronal.

6. Inhibición de GSK3 por estradiol. Efecto sobre β -catenina.

Como consecuencia de la actividad quinasa de Akt aumenta la fosforilación en Ser²¹ de GSK3 α o Ser⁹ de GSK3 β , modificación que se correlaciona con su inactivación (Cross et al. 1995) y trabajos previos describían una acumulación de β -catenina en el hipocampo como consecuencia del tratamiento con estradiol (Cardona-Gomez et al. 2004).

Dado que estradiol interfiere con la vía de señalización de PI3K/Akt/GSK3 y que GSK3 es capaz de modular la función transcripcional de β -catenina nos planteamos la posibilidad de que estradiol activara la función nuclear de β -catenina mediante la regulación de esta señalización intracelular. Para dichos estudios utilizamos neuronas primarias de corteza embrionaria y células N2a.

6.1.1 Inhibición de GSK3 tras la adición de estradiol en N2a y neuronas de corteza y acumulación de β -catenina.

En primer lugar comprobamos el efecto de estradiol sobre GSK3 en la línea celular N2a y neuronas primarias de corteza. Por un lado, con el fin de determinar si el efecto observado en el hipocampo es aplicable a otras células neuronales, y por otro para establecer las condiciones óptimas de tiempo y concentración del tratamiento para posteriores experimentos de regulación expresión génica.

Las células tratadas fueron lisadas y sus extractos analizados mediante WB usando diferentes anticuerpos que reconocen estados de fosforilación de la proteína GSK3. En ambos tipos neuronales detectamos inhibición de la actividad de GSK3, que se observa con un anticuerpo dirigido contra la fosforilación en el residuo de Ser⁹ para GSK3 β y Ser²¹ para GSK3 α . En los extractos celulares obtenidos de N2a, la abundancia relativa de GSK3 β -PSer⁹ es mayor a la de GSK3 α -PSer²¹ y debido a ello resulta más evidente el incremento de fosforilación en la isoforma GSK3 β . Los resultados de la inhibición de GSK3 en neuronas primarias de corteza se muestran en la figura 11, los obtenidos de extractos celulares de N2a en la figura 12.

Los datos indicaron que se puede observar incremento en la fosforilación inhibitoria de GSK3 a concentraciones bajas de estradiol (10nM) y que el máximo de inhibición de GSK3 (Ser^{9,21}-GSK3) se alcanza a una concentración entre 100nM y 200nM (2.5 ± 0.5 , n=4). Las concentraciones de estradiol que comprobamos en un primer lugar sobre la línea N2a varían entre 10 nM y 500nM ya que ésta es la concentración con la que se obtiene un efecto de protección máximo en trabajos anteriores.

En cuanto a la cinética de tiempos se observa que es detectable desde los 20 minutos del tratamiento, alcanzando un máximo de fosforilación entre 60 y 90 minutos (5 ± 1 , n=4), tras el cual el estado total de fosforilación en el residuo de serina es revertido hasta alcanzar el nivel basal de las células a los 120 minutos del tratamiento (Fig. 12, Fig.13).

Podemos comprobar que en buena correlación con la inhibición de GSK3 β , se observa un aumento en la cantidad total de β -catenina (3.5 ± 0.5 , n=3) en neuronas de corteza (Fig. 12) y en N2a (Fig.13).

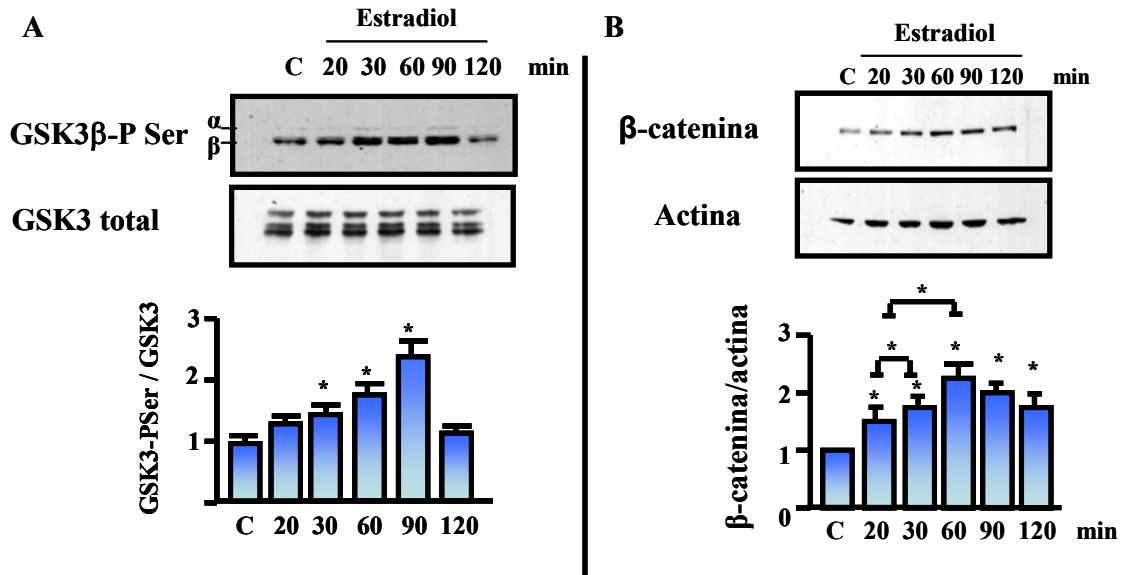


Figura 11. Estradiol incrementa la fosforilación en Ser^{9,21}-GSK3 en neuronas de corteza. A. Utilizando una concentración de estradiol 200 nM se observa en neuronas primarias un incremento de la fosforilación de Ser^{9,21}-GSK3 máximo entre 30 y 90 minutos (2.2 ± 0.5 , $n=3$). En el **panel B** se observa la variación en los niveles totales de β-catenina (2.2 ± 0.3 , $n=3$). Datos derivados de $n=3$ experimentos independientes. * $p \leq 0.05$.

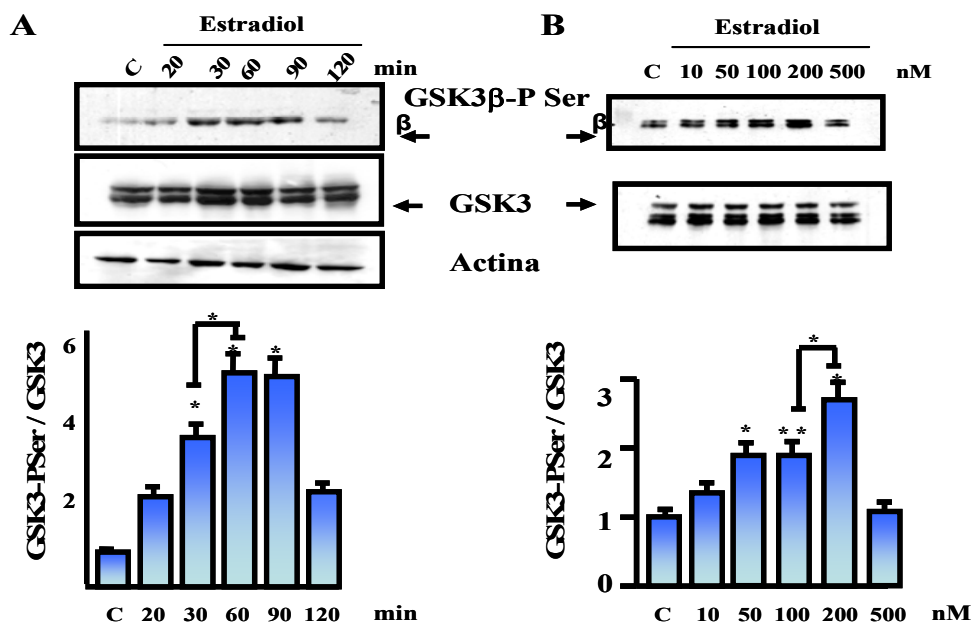


Figura 12. Estradiol incrementa la fosforilación en Ser^{9,21}-GSK3 en células neuronales N2a. Determinación de parámetros: tiempo y concentración. En el panel izquierdo se muestra el aumento en la fosforilación de GSK3 en serina a diferentes tiempos del tratamiento con estradiol a una concentración de 200 nM. En la imagen se muestran las bandas correspondientes a GSK3 β (β1 y β2). En el panel derecho, se muestra el efecto de estradiol sobre la fosforilación de GSK3 utilizando diferentes concentraciones del mismo. Datos procedentes de $n=4$ experimentos independientes. Se indica la significancia estadística (Student's t-test) ** ($P \leq 0.05$), * ($P \leq 0.01$).

6.1.2 El bloqueo de los receptores de estrógenos impide la acumulación de β -catenina mediada por estradiol.

Para analizar si el efecto inducido por estradiol sobre los niveles de β -catenina era dependiente de los receptores ER α y ER β , llevamos a cabo experimentos en paralelo en los que se añadió el antagonista de los receptores ICI 182,780 en las células N2a en un tratamiento previo al de estradiol.

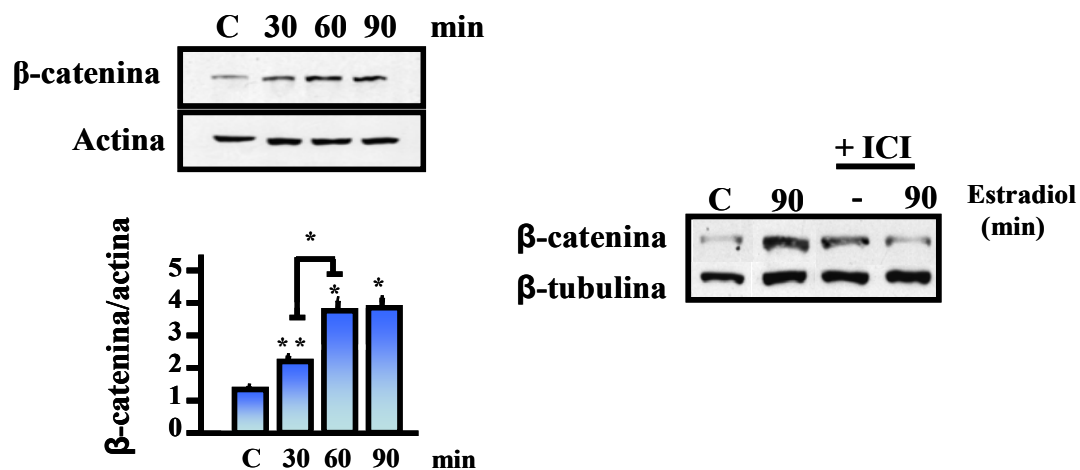


Figura 13. El efecto de estradiol sobre la estabilización de β -catenina es dependiente de la disponibilidad de ERs. En células N2a se analizó la curva temporal de estabilización de β -catenina por estradiol (izquierda) y se realizó un tratamiento con ICI 182,780, antagonista de ERs, previo a la adición de estradiol en el tiempo de máxima acumulación (dcha). Tras 90 minutos de bloqueo se añadió estradiol a 200nM durante los tiempos indicados en la figura. Se observa cómo la adición previa de ICI al cultivo impide el efecto de estabilización mediado por estradiol. La gráfica muestra los valores obtenidos a partir de n=3 experimentos independientes. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,005$.

Los extractos correspondientes fueron analizados usando el anticuerpo contra β -catenina total. En primer lugar comprobamos que tiene lugar en este tipo celular una cinética de acumulación de β -catenina similar a la que ocurre en las neuronas de corteza, obteniendo un máximo en sus niveles totales a los 60 min del tratamiento con estradiol.

Con el uso del antagonista ICI previo a la adición de estradiol se reduce en gran medida los niveles alcanzados de β -catenina, que se mantienen en una cantidad de β -catenina total similar a la de la situación control con la combinación ICI más estradiol (Fig. 13). Cabe destacar que el tratamiento de ICI por sí solo aumenta la estabilización de β -catenina de manera significativa y es en la competición de estradiol e ICI por los sitios de unión a ligando de los diferentes receptores cuando observamos una disminución en los niveles de β -catenina.

6.1.3. Estradiol promueve la acumulación de β -catenina defosforilada en los residuos de GSK3.

Para evaluar la implicación de Akt en el aumento de β -catenina inducido por estradiol, tratamos las células N2a con un inhibidor de Akt, Akt-Inh-V, a una concentración de 10 μ M durante 1h antes de la administración de estradiol. Los extractos celulares fueron analizados mediante WB, usando el anticuerpo específico que reconoce β -catenina total. Los datos indican que la inhibición de la actividad de Akt resulta en la ausencia de efecto de estradiol sobre la estabilización de β -catenina (Fig. 14).

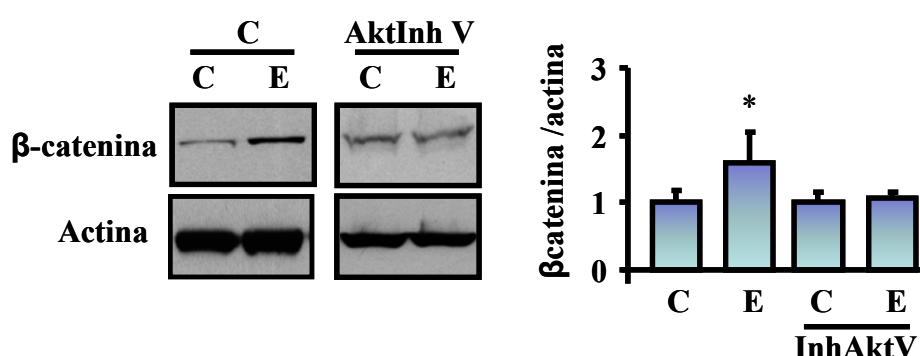


Figura 14. La inhibición de Akt boquea el efecto mediado por estradiol sobre GSK3 y β -catenina. Las células N2a se trataron con el inhibidor de Akt (Inhibidor V, 1 μ M, 1h), a continuación se realizó el tratamiento de estradiol 100nM durante 1h. Las gráficas representan los datos obtenidos mediante inmunodetección relacionando los valores de densidad óptica respecto al control. El aumento observado en el nivel de β -catenina tras el tratamiento de estradiol es reducido con la inhibición de Akt. * $p \leq 0,05$.

A continuación quisimos analizar si el aumento de β -catenina que observamos con la adición de estradiol es debido a la disminución de la actividad de GSK3 de una manera directa. Para ello, analizamos el estado de fosforilación de los residuos diana de GSK3 utilizando un anticuerpo que reconoce de manera específica la región N-terminal de β -catenina cuando se encuentra defosforilada en dichos residuos (anti- β -catenina activa que reconoce Ser³⁷ y Thr⁴¹ defosforilados) utilizando extractos totales obtenidos a partir de las células N2a.

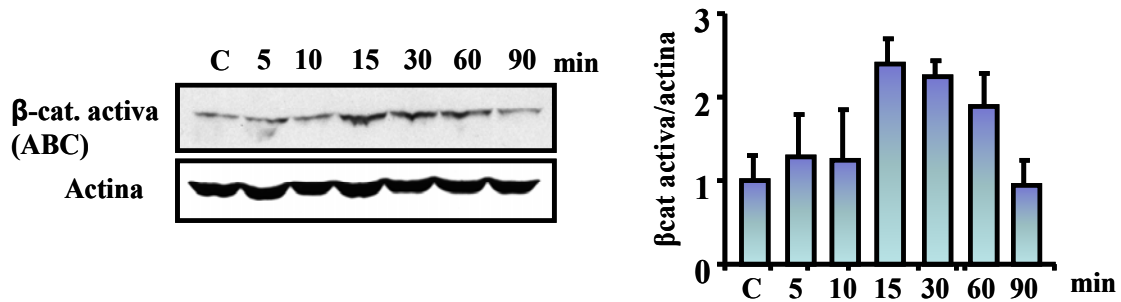


Figura 15. La acumulación de β-catenina inducida por estradiol es debida a su estabilización por pérdida de fosforilación dependiente de GSK3. El tratamiento de estradiol en células N2a induce disminución de la fosforilación de los residuos Ser³⁷ y Thr⁴¹, ambos fosforilados por GSK3, como se muestra en la figura utilizando el anticuerpo que reconoce estos residuos de β-catenina cuando se encuentran defosforilados. Datos provenientes de n=2 experimentos independientes. (Anticuerpo “ABC”: *active-binding-βcatenin*)

Los WB correspondientes indican un aumento de inmunoreactividad (de 2.4 veces respecto al control a los 15 minutos del tratamiento) con el anticuerpo que reconoce los residuos Ser³⁷ y Thr⁴¹ de β-catenina de-fosforilados con el tratamiento de estradiol (Fig. 15)

De esta manera vemos cómo la estabilización de β-catenina se debe a la pérdida de fosfatos de su extremo N-terminal en aquellos residuos que son diana específica de GSK3.

6.1.4. Análisis de la distribución de β-catenina tras la adición de estradiol.

β-catenina es una proteína con funciones duales, por un lado, participa en la adhesión celular y por otro en la regulación de la transcripción. Para comprobar si la estabilización mediada por estradiol se veía reflejada en alguna de las subpoblaciones de β-catenina comprobamos mediante fraccionamiento celular en qué compartimentos se podía encontrar mayor cantidad de β-catenina tras los tratamientos.

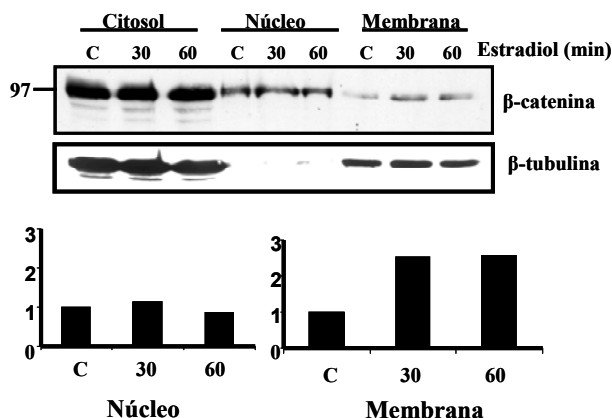


Figura 16. Distribución de β-catenina tras la exposición de N2a a estradiol. Se realizaron fraccionamientos subcelulares (soluble, membrana y núcleo) en células control y tratadas con estradiol 100nM a diferentes tiempos. No observamos en ningún caso un tránsito de la fracción de β-catenina del citosol al núcleo, sin embargo sí se observa un ligero incremento en la fracción enriquecida en membrana con el tratamiento de estradiol. Datos procedentes de n=2 repeticiones independientes.

Mediante fraccionamiento subcelular se estudió la localización de β -catenina, con un anticuerpo que reconoce la región C-terminal. Las células N2a se trataron con estradiol durante 30 o 60 minutos y se comparó con la distribución de β -catenina en la situación control.

Nuestros datos indican que hay una localización mayoritaria de β -catenina en el citosol siendo también abundante en el núcleo. En contraposición, la fracción de β -catenina asociada a la fracción de membranas es escasa en el control. Tras el tratamiento con el estradiol durante 30 minutos, es destacable la movilización de β -catenina hacia la fracción enriquecida en membranas (Fig. 16). Sin embargo, no detectamos acumulación nuclear de β -catenina utilizando el anticuerpo anti- β -catenina total en los tiempos de tratamiento estudiados.

6.1.5. Estradiol modifica la actividad transcripcional mediada por proteínas TCFs.

A pesar de no observar un aumento evidente de β -catenina total en la fracción nuclear a tiempos cortos de estradiol, elegimos un sistema de detección de actividad transcripcional específico para complejos β -catenina/TCFs, por ser mucho más sensible. El sistema de detección de actividad transcripcional dependiente de TCFs utilizado permite analizar dicha función con elevada sensibilidad, ya que esta acoplado a la síntesis de la enzima luciferasa (plásmido TOPFlash, ver descripción en *Materiales y Métodos*).

Para ello, las células fueron inicialmente transfectadas con el plásmido TOPFlash y tratadas a diferentes concentraciones y diferentes tiempos con estradiol 48 horas después de la transfección del plásmido reportero. Los extractos solubles de estas células se obtienen y la actividad se determina según se indica en *Materiales y Métodos*.

Los datos obtenidos indican que estradiol aumenta la actividad transcripcional mediada por el complejo β -catenina/TCFs a concentraciones análogas a la inhibición de GSK3, de 10 a 500 nM, siendo máxima a 100nM (Fig. 17 B). Los tiempos con los que se observa una mayor inducción es a los 60 minutos (24 ± 4 , $n=4$) (Fig. 17 A), acordes a los datos previamente descritos respecto a la inhibición de GSK3 y la estabilización de β -catenina.

Por otro lado cuando se usa un reportero luciferasa similar en el que se ha mutado la secuencia específica de unión a TCFs, denominado FOPFlash, nunca se obtiene activación transcripcional (Figura 17 C)

6.1.6. La interacción de estradiol con la actividad nuclear de proteínas TCF/LEF tiene lugar a través de los receptores de estrógenos, ER α y ER β .

Para comprobar si este efecto está mediado por los receptores de estrógenos, se añadió el antagonista ICI 182,780 antes de la adición de estradiol. Este tratamiento previo al de estradiol bloquea de manera significativa el efecto potenciador de estradiol sobre el reportero TCF/LEF-luciferasa (Fig. 17 C).

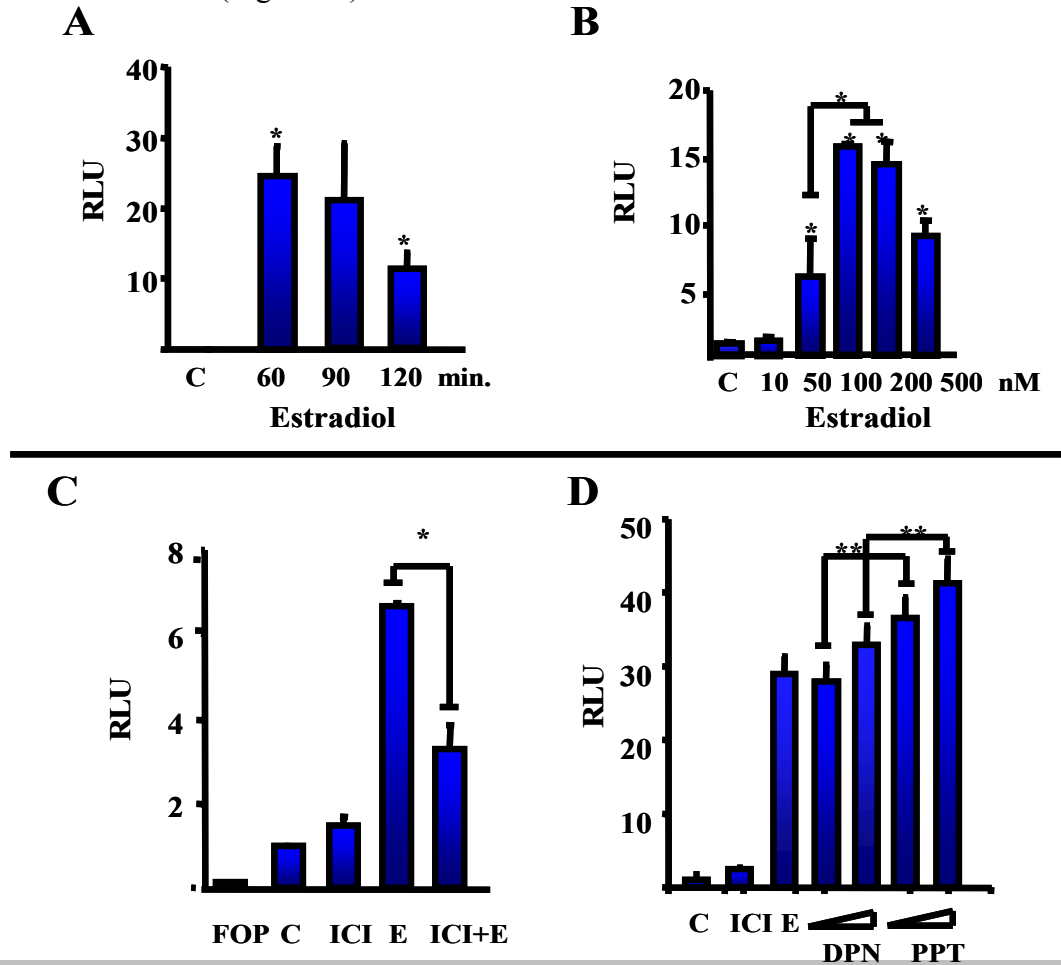


Figura 17. Estradiol aumenta la transcripción dependiente de TCF/LEF en células N2a. Se transfectaron N2a con plásmidos reporteros TOPFlash y FOPFlash y se trataron con estradiol a las concentraciones y tiempos utilizados anteriormente para el análisis bioquímico y en ausencia de suero. Las gráficas representan la inducción de la transcripción obtenida (en unidades arbitrarias, RLU) normalizadas respecto al nivel basal de transcripción. Los paneles superiores muestran que la inducción obtenida con estradiol es notable utilizando una concentración de 50 nM (**B**) y que a estas concentraciones el efecto es máximo entre 60 y 90 minutos (**A**). El bloqueo previo de los receptores de estrógenos con ICI (10 μ M, 2h) reduce la inducción de la transcripción mediada por estradiol (100nM, 60 minutos) (**C**). En la gráfica se muestra asimismo la especificidad de la respuesta obtenida utilizando para ello el plásmido control FOPFlash. (**D**) La adición de agonistas específicos de ER α (PPT) y ER β (DPN) inducen aumento en la transcripción dependiente de estradiol a través de TCFs (5 y 10 nM, durante 90 minutos). Se muestran en las gráficas los datos procedentes de n=3 experimentos independientes. *p \leq 0,05, **p \leq 0,001.

Con el fin de determinar qué isoforma del receptor de estrógenos aparecía implicado en este mecanismo se trataron las células con agonistas específicos para cada isoforma, DPN (agonista de ER β) y PPT (agonista de ER α) utilizando dos concentraciones para cada uno de ellos (10 y 20nM). En la figura 17 D se observa cómo tanto el agonista de ER α como el de ER β son capaces de incrementar la transcripción mediada por β -catenina/TCFs a concentraciones en las que ambos siguen manteniendo su especificidad por cada isoforma. Siendo en el caso del agonista de ER α , siempre un poco más potente que el de ER β (Fig. 17 D).

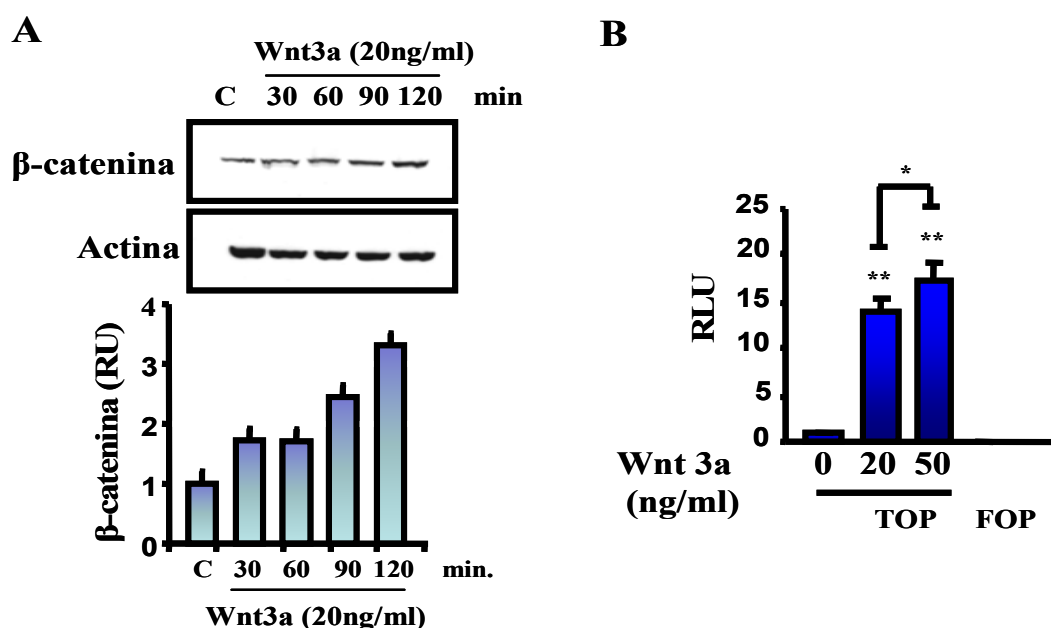


Figura 18. Respuesta de células N2a a la proteína Wnt3a. Las células N2a se trataron con la proteína soluble Wnt3a a una concentración de 20ng/ml a diferentes tiempos tras 24h en ausencia de suero. **A)** Se observa la estabilización de β -catenina en respuesta a la activación de la vía Wnt a partir de los 90 minutos manteniéndose el efecto incluso a los 120 minutos del tratamiento. **B)** Se realizaron tratamientos con la proteína Wnt3a soluble sobre células N2a transfectadas con el plásmido reportero TOPFlash a diferentes concentraciones. Como se muestra en la gráfica, la concentración de 20ng/ml es óptima para la inducción de la transcripción activada por Wnt3a en N2a. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,001$.

Los datos se muestran en valores relativos respecto a la situación control, es de destacar la variación entre la cantidad de inducción obtenida en la transcripción a lo largo de diferentes experimentos que consideramos debido a variaciones intrínsecas de las células, si bien en todos los casos observamos inducción por estradiol y bloqueo de la misma con el antagonista. Como control de la inducción transcripcional mediada por β -catenina analizamos la capacidad de Wnt3a (Roelink and Nusse 1991) a activar la vía de señalización canónica de Wnt, en las células N2a. Así hemos podido comprobar que la adición de Wnt3a genera una estabilización

de β -catenina entre los 60 y 120 minutos (Fig. 18 A), con una inducción de la transcripción del plásmido reportero TOPFlash, similar a la generada por la adición de estradiol (Fig. 18 B).

6.1.7 Estradiol aumenta la actividad transcripcional dependiente de proteínas TCF/LEF también en neuronas de corteza.

Para comprobar si el efecto observado hasta el momento tenía lugar en las neuronas primarias, analizamos la respuesta en neuronas de corteza embrionaria mantenidas 2 días en cultivo. Para ello, utilizando el mismo sistema reportero de la actividad de β -catenina, se introdujo el plásmido TOPFlash en las neuronas mediante electroporación.

La eficiencia de electroporación que se determinó introduciendo un plásmido de expresión de la proteína GFP, resultó ser en torno al 30% (datos no mostrados), lo que permite la cuantificación de la actividad luciferasa procedente del plásmido introducido.

Las neuronas transfectadas fueron tratadas con estradiol, y sus actividades transcripcionales se determinaron, después de la exposición a estradiol o a control de solvente o a insulina (usado en este caso como control positivo). Los datos cuantitativos muestran cómo se obtiene una respuesta de actividad mediada por β -catenina/TCF (4.8 ± 1.2 , $n=3$) (Fig. 19). Como se observa en la figura, en el caso de introducir en las células la construcción no activable por TCFs, denominada FOPFlash, la respuesta obtenida es nula, indicando especificidad de la respuesta obtenida.

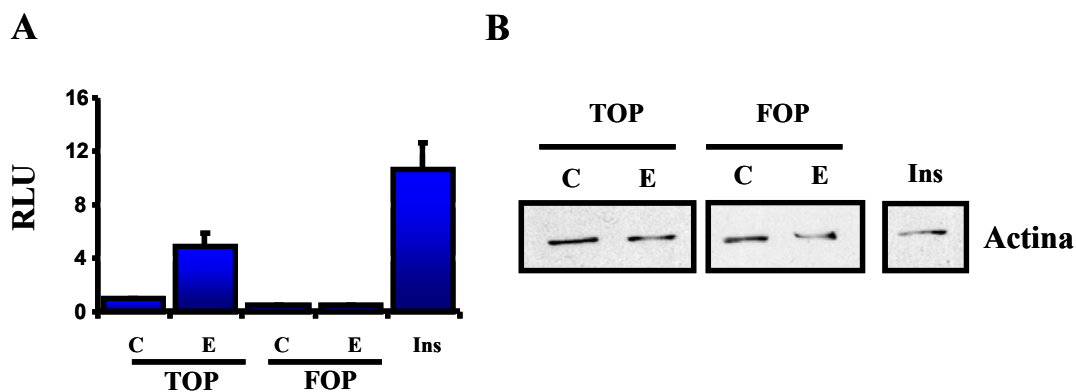


Figura 19. Estradiol induce un aumento en la transcripción mediada por TCF/LEF en neuronas primarias de corteza. Neuronas de corteza de embriones de 18 días se electroporaron para introducir el plásmido reportero TOPFlash o FOPFlash. Se trataron las neuronas de 2DIV con estradiol 100nM durante 60 minutos. Como control de la inducción se trataron las neuronas con insulina (5 μ g/ml). Como se observa en la gráfica la inducción observada es específica de la unión de TCFs al ADN ya que la inducción obtenida con FOPFlash es nula. **B.** La carga de proteína de los extractos para la obtención de la actividad luciferasa se comprobó por WB midiendo la cantidad de actina.

Como ensayo alternativo para describir la activación transcripcional de la vía β -catenina/TCFs por estradiol en neuronas, partimos de un cultivo de neuronas procedente de una colonia de ratones transgénicos TCF/LEF-LacZ, que expresan la proteína bacteriana β -galactosidasa bajo el control de un promotor dependiente de TCFs (según se esquematiza en la Fig. 20).

Las neuronas primarias de embriones de esta colonia fueron mantenidas en cultivo, y determinamos la acumulación de la proteína β -galactosidasa en *western blot* después de la administración de estradiol o Wnt3a (utilizado a 20ng/ml), que utilizamos como control positivo de inducción de transcripción mediada por β -catenina.

Nuestros datos indican un ligero incremento en los niveles de β -galactosidasa con ambos tratamientos cuando comparamos con el control de solvente, después de 3 horas (Fig. 20 B).

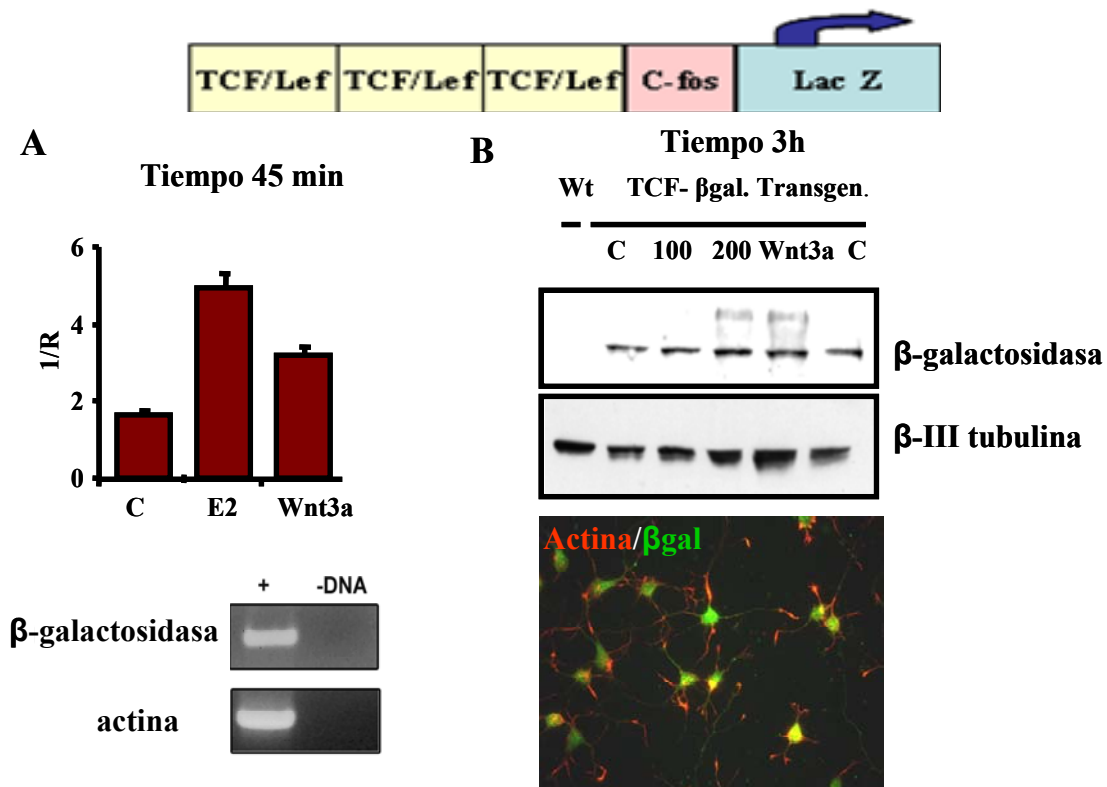


Figura 20. Expresión del gen *LacZ* en respuesta a estradiol en ratones transgénicos TCF/LEF-*LacZ*. El esquema representa la construcción de las secuencias de unión de las proteínas TCF/LEF junto al promotor c-Fos dirigiendo la expresión del gen *LacZ* (*Materiales y Métodos*). **A)** En la gráfica se representa los datos obtenidos tras el ensayo de RT-PCR cuantitativa a partir de la primera cadena de ADNc obtenida a partir de ARN total tras los tratamientos de estradiol 100nM o Wnt3a durante 45 minutos. Los datos de cuantificación del gen *LacZ* obtenidos a partir de *Lightcycler* se presentan normalizados respecto al gen constitutivo actina, que permanece invariable con ambos compuestos. La imagen inferior muestra la especificidad de los oligos diseñados para ambos genes en comparación con un control de amplificación sin molde de ADN. **B)** A partir de extractos de neuronas procedentes de la colonia TCF/LEF-LacZ se analizó la cantidad total de β -galactosidasa tras los tratamientos de estradiol 100-200 nM o Wnt3a 20ng/ml durante 3 horas. La imagen inferior muestra el análisis mediante inmunocitoquímica de la expresión basal de β -galactosidasa (verde), anticuerpo combinado con el marcaje de Faloidina (rojo) en neuronas de corteza de 2DIV de la colonia transgénica.

Debido que la estabilidad de β -galactosidasa se considera muy alta en sistemas heterólogos, hemos determinado la aparición del RNA mensajero de β -galactosidasa, como dato complementario. Por ello, se determinó mediante RT-PCR cuantitativa el aumento de la transcripción del gen *LacZ* inducido por estradiol o por Wnt3a. Para ello diseñamos oligonucleótidos específicos para el gen de interés, *Lac Z*, y para un gen constitutivo que en este caso escogimos el gen de actina.

A partir de cultivos neuronales de corteza del ratón transgénico, se aisló el ARN total tras tratar las neuronas con estradiol 100 nM durante 45 minutos o tratadas con Wnt3a 20ng/ml como control positivo. El tiempo fue seleccionado en función de la curva temporal observada previamente con el plásmido reportero, y se acortó al máximo con el fin de obtener la respuesta inicial a estradiol. La cuantificación del ARN específico para cada gen se determinó mediante la absorción de *SYBRgreen* (*Lightcycler*) durante el proceso de amplificación del ADN obtenido a partir del ARN (ver *Materiales y Métodos*).

Los datos cuantitativos indican que tanto la adición de estradiol como la de Wnt3a aumentan en torno a 2 veces la cantidad de ARN mensajero del gen *LacZ*. Como control se estudió el ARN mensajero correspondiente a actina que permanece invariable con ambos tratamientos (Fig. 20 A).

6.1.8. Tanto *ER α* como *ER β* interaccionan con β -catenina y GSK3 en N2a y en extractos de corteza embrionaria.

Dado que los datos previos que teníamos realizados en el laboratorio indicaban que en cerebros de ratonas se puede encontrar un complejo en el que *ER α* estaba asociado a GSK3 y β -catenina. Analizamos si en las células usadas para estos análisis transcripcionales existían complejos similares. Así, se realizaron inmunoprecipitaciones a partir del extracto total de células N2a o de extractos de corteza embrionaria en situación control con anticuerpos anti-*ER α* , anti-*ER β* .

Como control positivo de la inmunoprecipitación utilizamos el anticuerpo contra la proteína APC, componente de la vía de Wnt, que se sabe que acompleja GSK3 β y β -catenina.

Los datos indican que tanto *ER α* como *ER β* interaccionan con β -catenina y las dos isoformas de GSK3, α y β . En el panel se muestra la forma de *ER α* de 66 KDa, que es la forma mayoritaria observada en los ensayos de inmunoprecipitación. En el caso de la inmunoprecipitación con anticuerpos específicos de *ER β* se obtiene una elevada cantidad de cantidad de GSK3 en los ensayos realizados a partir de extracto total de células N2a (Fig. 21).

El control positivo utilizado, un anticuerpo dirigido contra APC, nos indica lo previsto, una cierta cantidad de β -catenina, y solo la presencia de GSK3 β .

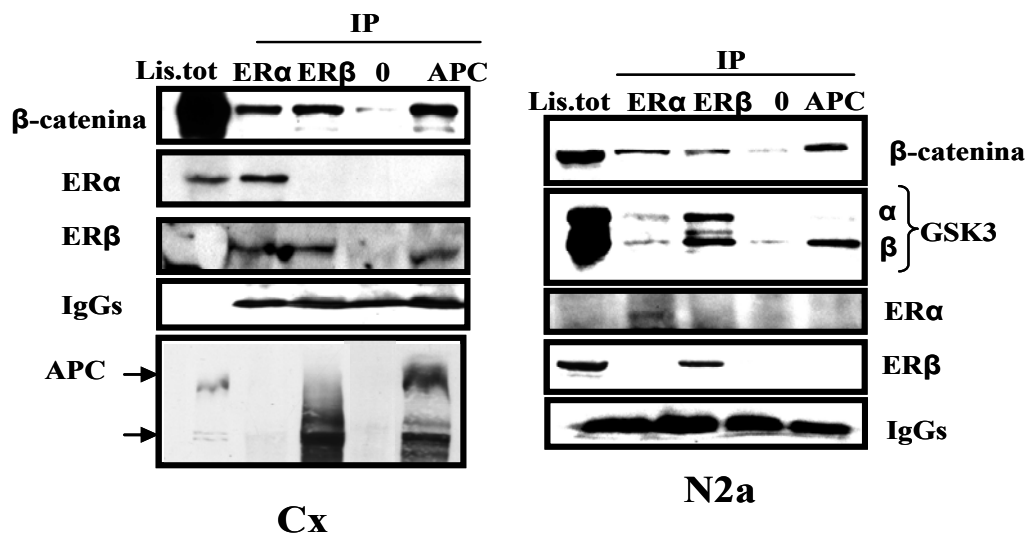


Figura 21. Los receptores de estrógenos α y β forman un complejo con β -catenina y GSK3 en N2a y en corteza embrionaria de ratón. Se inmunoprecipitaron ER α y ER β a partir de extracto total de N2a o de corteza embrionaria (E18) y se observan complejos similares con cada uno de ellos. Ambos interaccionan con β -catenina y con GSK3 α/β . La inmunoprecipitación de APC se realizó como control para la interacción de β -catenina y de GSK3 β . Como control negativo de la inmunoprecipitación se utilizaron IgGs irrelevantes que no mostraron interacciones inespecíficas.

En las inmunoprecipitaciones realizadas con el anticuerpo anti-APC no detectamos en ningún caso la presencia ni de ER α ni de ER β en las células N2a. Aunque sí aparece la isoforma ER β cuando utilizamos el anticuerpo anti-APC para inmunoprecipitar utilizando extractos de cortezas embrionarias. Cuando realizamos la inmunoprecipitación cruzada en extractos de cortezas obtenemos una proteína que se detecta con el anticuerpo utilizado anti-APC pero que presenta un tamaño menor (200 KDa) al de la proteína completa (312 KDa aproximadamente) y que no se detecta en el control de la inmunoprecipitación realizado con un suero pre-inmune de conejo.

6.1.9. Caracterización del complejo de proteínas TCFs con el ADN.

Centrándonos en el papel de estradiol como modulador de la actividad transcripcional mediada por β -catenina analizamos los factores de transcripción asociados a esta proteína, la familia TCF/LEF (Travis et al. 1991; Waterman et al. 1991). Para ello, sintetizamos oligonucleótidos conteniendo la secuencia específica de unión de las proteínas TCF/LEF

(*oligo wt*) y oligonucleótidos que contienen esa misma secuencia con las mutaciones descritas que impiden la unión de dichas proteínas (*oligo mut*) (ver *Materiales y Métodos*).

Así las células fueron tratadas con estradiol (30 min a 100nM), o con Wnt3a (20ng/ml) o con los controles correspondientes. A partir de estas células se obtuvieron los extractos de proteína nuclear como se indica en *Materiales y Métodos*. Se comprobaron varios tiempos con el fin de optimizar la cantidad del complejo detectado en los geles en función también de los parámetros obtenidos con los ensayos de actividad luciferasa previos.

Los oligonucleótidos correspondientes (*wt* y *mutante*) se marcaron con ATP radioactivo y se incubaron con los extractos de proteínas nucleares obtenidos de cada condición para permitir la generación de complejos ADN/proteína. Estos posibles complejos se pueden identificar en geles de acrilamida como una como banda de radiactividad correspondiente a la unión específica (por comparación con la competición del *oligo wt* no marcado versus *oligo mut* no marcado) de proteínas de la familia TCF/LEF con su secuencia específica del oligo.

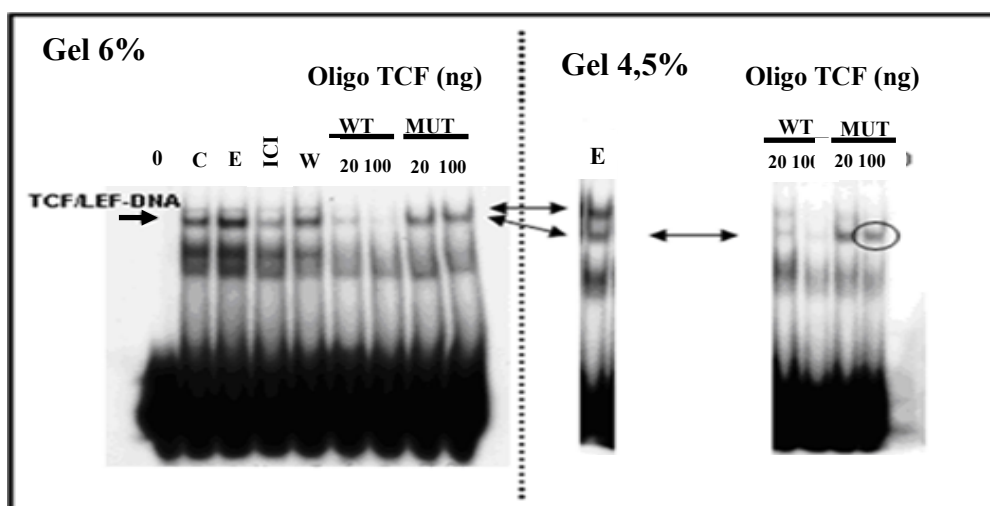


Figura 22 A. Identificación de la banda específica por ensayos de competición con el oligo mutado correspondiente a la secuencia de interacción de las proteínas TCFs con el ADN. Los extractos de proteínas nucleares se obtuvieron de células N2a y se incubaron 30 minutos con estradiol, ICI o Wnt3a. En la figura se muestra el patrón de bandas obtenido tanto con el análisis de las muestras en un gel de acrilamida al 6% como en un gel con acrilamida al 4,5%. De las dos bandas presentes en ambos geles y más evidentes en el gel de menor porcentaje de acrilamida, sólo la banda inferior se identificó como específica puesto que no es eliminada con la competición de la muestra con el oligo mutado

En la figura 22 A se muestran las bandas correspondientes a la formación de un complejo entre las proteínas nucleares de la familia TCF y su secuencia específica.

Nuestros datos indican que podemos identificar las bandas correspondientes al complejo (*flechas* en Figura 22 A) en células no estimuladas (controles) y que con estradiol o Wnt3a

durante 30 minutos se observa una mayor formación del complejo TCFs/ADN. Además, la adición del antagonista ICI disminuye ligeramente esta asociación.

6.1.10. Identificación del complejo TCF-ADN.

Con el fin de determinar qué miembro de la familia de proteínas TCFs está participando en este complejo proteína-ADN en este tipo celular, se realizó una incubación previa al ensayo de unión al ADN con los anticuerpos correspondientes a TCF1, LEF1 y TCF3, considerando que son estas las formas más abundantes en la etapa en formación del cerebro que nos interesa, en comparación con TCF4.

La unión del anticuerpo a la(s) proteína(s) que forma parte del complejo hace que la migración de dicho complejo en el gel sea menor o que no se genere.

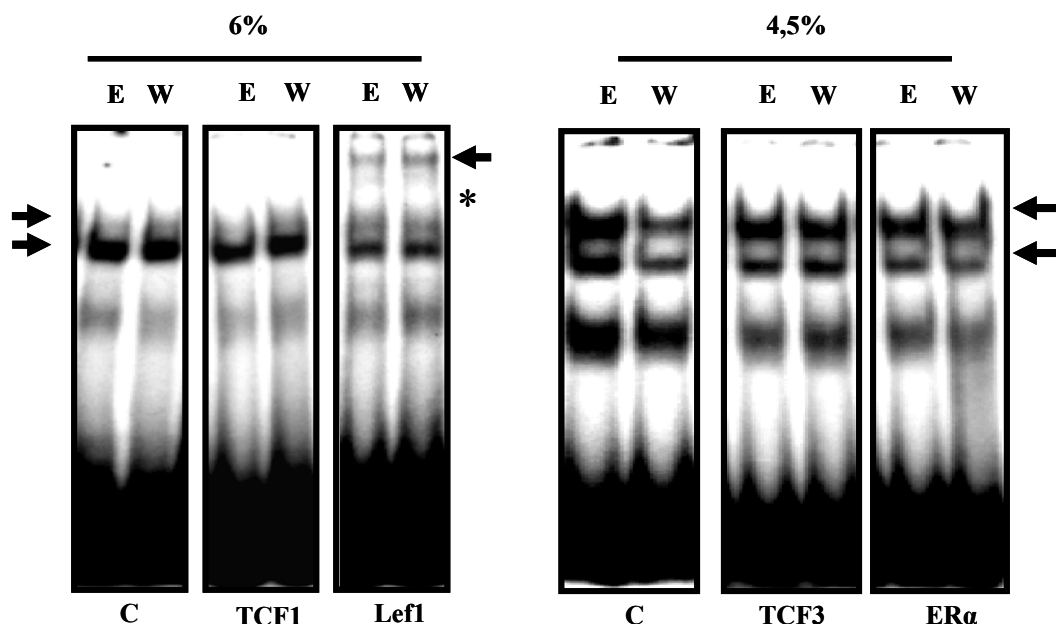


Figura 22 B. Análisis del complejo TCF-ADN. Se comprobó, mediante la incubación de los extractos nucleares con los anticuerpos específicos la presencia de cada miembro de la familia TCF/LEF o IgGs como control. Como se muestra en el panel, solo el anticuerpo anti-LEF1 consigue formar una banda con menor migración (flecha-asterisco). No se detectó ningún complejo con retardo en la migración del complejo inicial con TCF1 o TCF3 ni con el anticuerpo anti-ERα (C-terminal); n=3. Las bandas señaladas con las flechas indican la altura en el gel del complejo específico TCFs-ADN.

Nuestros datos indican que el retardo y/o pérdida de la banda correspondiente a la unión de estas proteínas con su secuencia en el ADN sólo se observó con el anticuerpo anti-LEF1 (Fig.22 B). Además, comprobamos también si ERα podría formar parte de ese complejo de la misma forma, sin embargo no se detectó ninguna banda con menor migración cuando incubamos la mezcla proteína-molde con anticuerpos específicos anti-ERα, se muestra en la figura el uso del anticuerpo anti-C terminal de ERα.

6.1.11. Estradiol requiere la unión de β -catenina a LEF para modificar la actividad transcripcional de β -catenina.

A continuación, nos planteamos analizar si para obtener activación transcripcional de TCFs con estradiol es necesaria la formación de un complejo β -catenina/TCFs.

Para ello, realizamos inmunoprecipitaciones a partir de extracto total de células N2a utilizando el anticuerpo anti-ER α y ER β para analizar un posible complejo con TCFs en los que no pudo detectarse dicha interacción.

Dado que LEF1 fue el único miembro detectado en el ensayo de retardo en gel de los extractos de proteínas nucleares quisimos analizar la importancia de la unión de β -catenina a la proteína LEF1 para que estradiol sea capaz de inducir el efecto observado en transcripción.

Con estos datos, decidimos sobre-expresar una construcción de la proteína LEF1 en la que se ha delecionado la región N-terminal de su secuencia (denominado en las figuras como Δ 56LEF1), y que debido a la falta de interacción con β -catenina resulta ser un dominante negativo para la activación de la transcripción (Aoki et al. 1999).

6.1.12. Efectos de la sobre-expresión de Δ 56LEF1 sobre la transcripción del plásmido TOPFlash y el plásmido reportero pENP1-luc en N2a.

Para comprobar el efecto de la expresión de Δ 56LEF1 sobre la transcripción del plásmido reportero TOPFlash, en primer lugar transfectamos células N2A con los plásmidos Δ 56LEF1 y con TOPFlash utilizando una cantidad fija de plásmido reportero (0.75 μ g) se fue variando la cantidad de plásmido de expresión de Δ 56LEF1 desde 0.15 a 0.8 μ g. Mediante WB puede observarse cómo el promotor es sensible a la expresión de la Δ 56LEF1 en función de la cantidad de proteína expresada (Fig. 24 A). La cantidad de plásmido de expresión Δ 56LEF1 en relación con la actividad transcripcional de reportero TOPFlash quedó de esta manera establecida, por el resultado obtenido sobre la actividad luciferasa, en 0.5-0.8 μ g Δ 56LEF1 y 0.75 μ g TOPFlash.

6.1.13. Estradiol incrementa la expresión de luciferasa en el plásmido reportero pENP1-luc.

Para comprobar que la regulación que estamos describiendo es relevante para promotores endógenos, utilizamos un plásmido reportero que contiene una región que comprende las

secuencias de unión de las proteínas TCF/LEF del promotor de Engrailed 2, proteína regulada por Wnt {McGrew, 1999 #372} (Fig. 24 esquema superior). De la transfección de este sistema de detección de actividad transcripcional mediada por β -catenina, se obtiene tras un tratamiento de estradiol a 100 nM durante 60 minutos, de nuevo una inducción de entre tres y cuatro veces del promotor de Engrailed 2 (Fig.23).

6.1.14. La activación del reportero En2-luciferasa por estradiol también se bloquea cuando se sobre-expresa la construcción $\Delta 56LEF$.

Para comprobar que el mecanismo de inducción transcripcional es similar, trataremos de determinar si la expresión de $\Delta 56LEF1$ modifica la activación sobre la inducción del promotor mediada por estradiol.

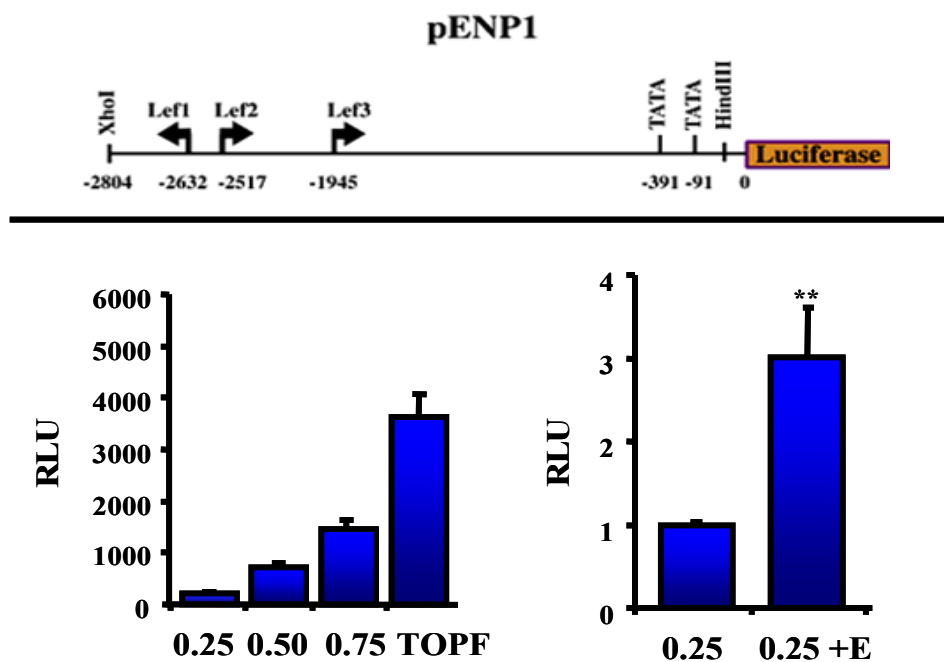


Figura 23. La construcción reportero pENP1-luciferasa responde a estradiol. A) El esquema representa la estructura de la construcción del plásmido reportero en la que la región proximal del promotor endógeno de *engrailed 1* con sitios específicos para la unión de proteínas TCF (LEF) se ha acoplado al gen de la luciferasa (ver *Materiales y Métodos*). Se transfectaron N2a con diferentes cantidades del plásmido pENP1 (0.25, 0.5 y 0.75 μ g). **B)** La gráfica representa los datos de actividad luciferasa obtenidos con las diferentes cantidades del plásmido pENP1 y en comparación a la transfección de 0.75 μ g del reportero TOPFlash. Las gráficas con los datos de actividad luciferasa muestran los resultados normalizados de tres experimentos diferentes. n=3. El valor P de *Student-t-test* es ** ($P \leq 0.01$) comparados con los datos control.

Así las células de neuroblastoma fueron co-transfectadas con el plásmido p-En2-luc combinado con pcDNA3.1 control o con p $\Delta 56LEF1$. Después de 48 horas de expresión se

efectuaron los tratamientos con el solvente control o con estradiol y se midió la actividad luciferasa. En la figura 24 B, se muestran las cuantificaciones de la actividad luciferasa obtenidas en situación control en comparación con la expresión de $\Delta 56$ LEF1. Se puede observar que la expresión de $\Delta 56$ LEF1 reduce en gran medida el efecto de estradiol indicando que para la activación del promotor a través de estradiol se necesita la formación de un complejo β -catenina/LEF/ADN.

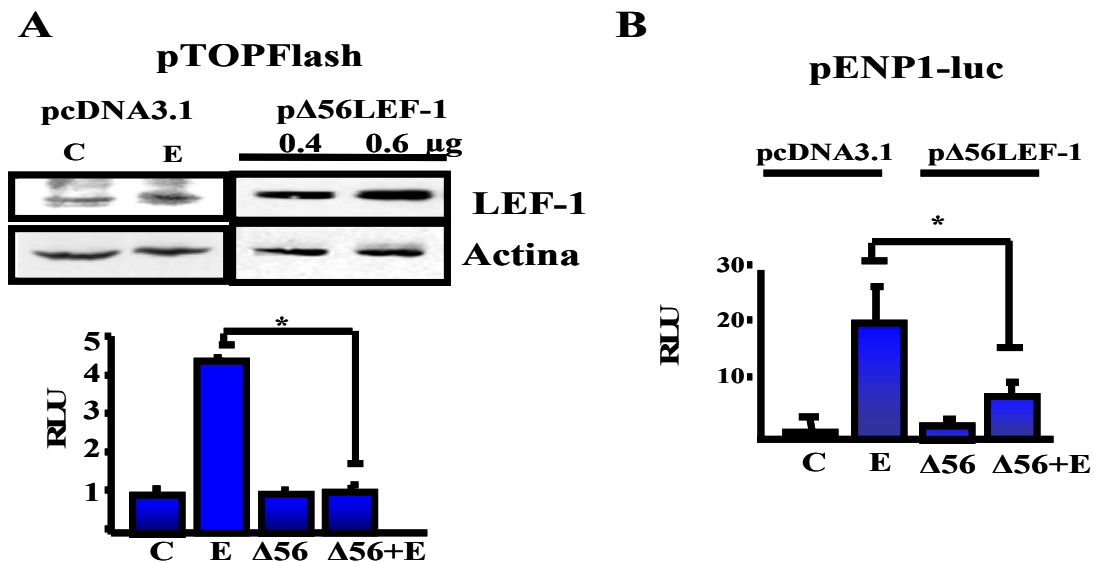


Figura 24. La interacción de β -catenina con LEF1 es esencial para la inducción de genes mediada por estradiol en sitios de unión de proteínas TCF. **A)** Se comprobó la expresión del plásmido $\Delta 56$ LEF1 utilizando diferentes cantidades de dicha construcción en la transfección de las células N2a (400-600ng). En la gráfica se representa la actividad luciferasa obtenida en células N2a control y en células N2a transfectadas con $\Delta 56$ LEF1 en respuesta a estradiol. **B)** Estradiol induce la actividad luciferasa sobre el plásmido reportero pENP1-luc (8-15 veces), sin embargo este efecto se ve reducido con la sobreexpresión de $\Delta 56$ LEF-1. En ambos casos, se representa la inducción de actividad luciferasa en unidades relativas (RLU) normalizado frente a los niveles obtenidos en la situación control. Valor P de *Student's t-test* es * ($P \leq 0.05$).

El tratamiento con estradiol no induce cambios en la cantidad total de LEF1 a los 90 minutos del tratamiento como se observa en la figura en la que se muestra la cantidad de LEF1 utilizando un anticuerpo que reconoce su región N-terminal (Fig. 24 A). La expresión de la delección se detectó utilizando un anticuerpo que reconoce la región de unión al ADN de la proteína LEF1 conservada intacta en la construcción introducida en las células.

6.1.15. Efecto de Estradiol sobre la forma no regulable por fosforilación de β -catenina (S33Y- β -catenina).

Como se ha comentado en la introducción, una mutación en los residuos de fosforilación de β -catenina de su extremo N-terminal regulados por GSK3 permite que la proteína alcance altos niveles por pérdida de regulación de su degradación. Para analizar la posible sensibilidad del sistema a los niveles de fosforilación de β -catenina disponemos de un plásmido de expresión de β -catenina mutada en su Serina 33 por Tirosina (S33Y) de forma que actúa de manera activa constitutiva al ser expresada en las células. Así procedimos a la co-expresión del mutante de β -catenina y del reportero TOPFlash y comprobamos la sobre-expresión de β -catenina en condiciones basales y después de un tratamiento de estradiol 100 nM, durante 60 minutos.

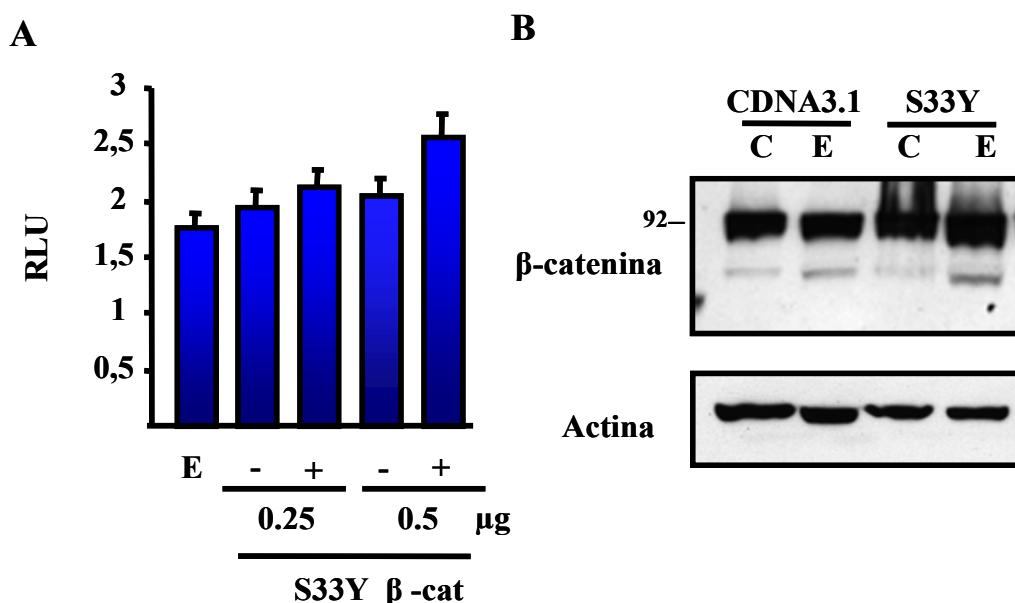


Figura 25. Efecto de estradiol sobre β -catenina S33Y. A) Se expresó la mutación S33Y β -catenina en células N2a y se transfectaron con el plásmido reportero TOPFlash. La sobreexpresión de S33Y β -catenina induce niveles de transcripción elevados en situación control. En la gráfica se representan los datos de actividad luciferasa obtenidos tras la adición de estradiol durante 60 min en células control en comparación con los tratamientos con estradiol sobre células transfectadas con S33Y β -catenina. Se muestran los resultados obtenidos con la transfección de dos cantidades diferentes del plásmido S33Y β -catenina (0.25 y 0.5 μ g). B) Niveles totales de β -catenina en N2a transfectadas con el plásmido de expresión S33Y β -catenina y en la transfección control cDNA3.1 vacío. En la situación de altos niveles basales de β -catenina estabilizada por la mutación S33Y, la adición de estradiol no induce un cambio en los niveles de actividad transcripcional de β -catenina (comparación de adición de estradiol con 0.5 μ g S33Y β -catenina en control y estradiol. No se encontraron diferencias estadísticas entre los tratamientos de estradiol y sus controles con el plásmido S33Y β -catenina. n=3.

Como podemos comprobar en la figura 25 B, los niveles de expresión de β -catenina son un poco más altos en las células transfectadas con el plásmido de expresión de la forma mutada.

El anticuerpo anti- β -catenina total detecta además una banda de menor tamaño que parece incrementar con los tratamientos de estradiol cuya identidad está por determinar por el momento.

Cuando en paralelo realizan los niveles transcripcionales se puede comprobar cómo la variante mutada sin necesidad de estímulo (estradiol) ya tiene niveles tan altos como el estradiol, y que la adición de la hormona no incrementa en exceso la activación transcripcional (de 2 veces a 2, 5 veces) (Fig. 25 A) Esto parece indicar que el papel que la hormona ejerce en la activación de β -catenina es dependiente de la regulación por fosforilación de ésta, al menos en parte.

6.1.16. Generación de una línea celular estable $\Delta 56\text{LEF-1/N2a}$.

Nos planteamos entonces determinar cuáles son los genes que, inducidos por estradiol, son expresados a través de un complejo β -catenina /LEF1. Para ello necesitamos disponer de un sistema de estudio adecuado en el que se pueda comparar la expresión génica mediada por estrógenos a través de ER-ERE con nuestra hipótesis de trabajo: genes de respuesta a estrógenos modulados por LEF1-ADN.

Como se ha mostrado en los resultados anteriores, la expresión de la forma delecionada de LEF1 suprime el efecto de estradiol sobre promotores con sitios TCF. Por tanto una opción es generar una línea de N2a transfectada establemente con el plásmido $\Delta 56\text{LEF1}$.

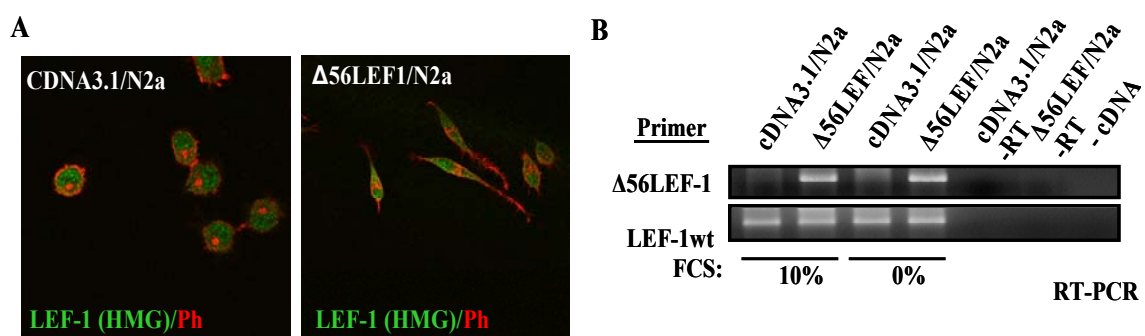


Figura 26. Generación de una línea de N2a de expresión estable para la proteína $\Delta 56\text{LEF-1}$. Se co-transfectaron las células con el plásmido $\Delta 56\text{LEF-1}$ o cDNA3.1 como control junto con un plásmido con el gen de resistencia a puomicina (ver *Materiales y Métodos*). **A)** Se analizó en primer lugar la morfología de las células estables generadas con la delección de LEF1 por inmunocitoquímica (anti-LEF-HMGbox en verde, Faloidina en rojo). **(B)** Se comprobó la expresión de la construcción introducida a partir del ARN y diseñando oligos específicos que reconocen o bien la proteína LEF1 completa o la proteína delecionada. Tras la generación de ADNc mediante una reacción reversa y posterior amplificación se analizaron los productos obtenidos en geles de agarosa. La construcción introducida se expresa por igual en las células estables en presencia y en ausencia de suero (marcado en la figura como FCS, fetal calf serum).

Para ello, transfectamos células N2a con el plásmido de expresión $\Delta 56\text{LEF1}$ o cDNA3.1 para el control y un plásmido de selección de las células co-transfectadas con resistencia a puromicina. De esta co-transfección y posterior selección con puromicina se obtuvieron las líneas estables que denominamos cDNA3.1/N2a y $\Delta 56\text{LEF1/N2a}$.

En primer lugar, se observó un cambio morfológico bastante evidente en las células $\Delta 56\text{LEF1/N2a}$ con respecto a las células cDNA3.1/N2a. Mientras que las células cDNA3.1/N2a mantienen una morfología redondeada característica de las células N2a originales cuando se mantienen en presencia de suero 10%, las células $\Delta 56\text{LEF1/N2a}$ presentan una morfología fusiforme más propia de una célula diferenciada.

Estas diferencias morfológicas se hacen más notables cuando se elimina el suero del medio de cultivo durante 24h. Las células se fijaron y se analizaron mediante inmunofluorescencia usando los anticuerpos contra anti-LEF-HMGbox (Fig. 26 A). La presencia del gen transfectado se comprobó mediante RT-PCR utilizando oligonucleótidos específicos del gen $\Delta 56\text{LEF1}$ (Figura 26 B).

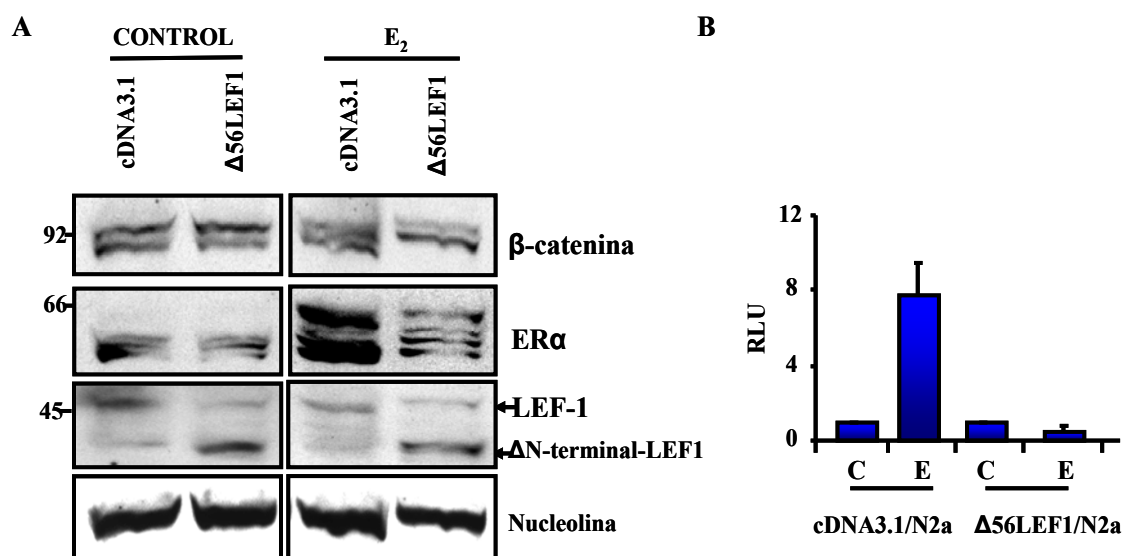


Figura 27. Expresión de LEF1 en extractos nucleares de pcDNA3.1/N2a y p $\Delta 56\text{LEF1/N2a}$. Se comprobó la presencia de la construcción $\Delta 56\text{LEF1}$ en extractos nucleares de la línea estable utilizando un anticuerpo que reconoce el dominio central de la proteína LEF1 (dominio *HMG box*). La adición de estradiol no modifica la cantidad de $\Delta 56\text{LEF1}$ en el núcleo ni la cantidad de β -catenina, como control de la cantidad de carga total se utilizó nucleolina. En la gráfica de la derecha se representa la medida de actividad luciferasa a partir de extractos de células N2a control (pcDNA3.1/N2a) en comparación con la línea estable (p $\Delta 56\text{LEF1/N2a}$) con un tratamiento de estradiol 100 nM de 60 minutos. Para la actividad luciferasa se transfectó el plásmido reportero TOPFlash. Como vemos, la línea estable p $\Delta 56\text{LEF1/N2a}$ no presenta respuesta a estradiol sobre dicho reportero. La gráfica muestra la actividad luciferasa en unidades relativas (RLU) normalizadas respecto al control sin tratar. n= 3. Valor P* de Student's t-test ** ($P \leq 0.01$).

Para comprobar en qué medida se expresa la proteína truncada $\Delta 56\text{LEF1}$ en las células $\Delta 56\text{LEF1/N2a}$, aislamos proteínas nucleares y se analizan mediante WB. Así es posible detectar la diferencia de tamaño de la proteína LEF1 con respecto a la mutante $\Delta 56\text{LEF1}$ (Fig. 27). En la figura se muestran en paralelo el WB utilizando anticuerpos contra LEF-1, también β -catenina y el receptor de estrógenos α . Así podemos observar que tras un tratamiento con estradiol de 60 minutos existe una mayor cantidad de $\text{ER}\alpha$ (60-66KDa) en el núcleo de cDNA3.1/N2a y $\Delta 56\text{LEF-1/N2a}$ (Fig. 27 A).

Una última comprobación de la línea estable obtenida, fue estudiar su funcionalidad sobre el plásmido reportero para la actividad transcripcional de β -catenina. La gráfica muestra la capacidad transcripcional de las dos líneas celulares utilizando de nuevo el sistema reportero TOPFlash en situación control y con un tratamiento de estradiol durante 60 minutos, comprobando de nuevo la pérdida del efecto del estradiol en las células $\Delta 56\text{LEF1/N2a}$ (Fig. 27 B).

6.1.17. Análisis de la expresión génica mediada por estradiol en las células pcDNA/N2a y p $\Delta 56\text{LEF1/N2a}$.

Una vez comprobado que las células generadas por transfección estable se comportan de igual manera que en el caso de la transfección transitoria en su respuesta a estradiol y activación de transcripcional dependiente de LEF1, procedimos al análisis de la expresión génica, mediante análisis diferencial de ARNm (*microarrays*) a partir del ARN total de las dos líneas celulares (pcDNA/N2a y $\text{p}\Delta 56\text{LEF1/N2a}$), en dos situaciones diferentes: control y tratadas con estradiol durante 60 minutos. A este experimento se le añadió un tratamiento de igual duración con la proteína recombinante Wnt3a para efectuar una comparación entre los genes activados por estradiol y los activados por la vía Wnt. El tiempo del tratamiento (60 minutos) con ambos compuestos fue determinado en un primer momento debido a que el efecto que ejerce estradiol sobre esta ruta de señalización ocurre a tiempos cortos (observándose acumulación de β -catenina desde los primeros 20 minutos en las medidas de actividad luciferasa que requieren síntesis proteica).

Tras el tratamiento se obtuvo el ARN total de las células y fue analizado mediante *arrays* de ARN. La tabla que contiene la información de los datos obtenidos por el análisis de *microarrays* se encuentra adjunta en el CD.

Los datos de los *arrays* vienen expresados en términos de veces de incremento o disminución de cada ARNm específico de cada proteína respecto al material proveniente de células no tratadas (variaciones de los valores expresados en $\log_2 R$).

Nuestros datos vienen clasificados en dos bloques que corresponden a: **bloque A**, células N2a establemente transfectadas con el plásmido vacío pcDNA3.1, y **bloque B**, células N2a establemente transfectadas con el plásmido de expresión de $\Delta 56LEF1$.

Eliminamos en primer lugar todos los genes que respondían a estradiol pero no eran sensibles a LEF1 (es decir, aquellos cuya relación entre los bloques A y B era idéntica).

Del total de genes restantes se realizó un primer punto de corte para su análisis fijando el mínimo de variación en al menos 2 veces ($\log_2 R \leq 1$ o $\log_2 R \geq 1$). A partir de aquí, los genes fueron divididos según eran incrementados (102 genes) por estradiol respecto a la situación control en células cDNA3.1/N2a o disminuídos (121 genes). Con el tratamiento de Wnt se incrementan 137 genes y se reducen 166 respecto al control. De este primer listado de genes activados en cada tratamiento observamos que existe poca similitud en genes modificados por estradiol y por Wnt3a en las células N2a dependientes de LEF1.

Nos interesaba comparar el aumento o disminución de cada gen común que se encontrara en la lista de genes del **bloque A** y del **bloque B**. Por ello, los datos obtenidos de los *arrays* se trataron de forma que, para los genes compartidos en las dos listas, se realizó la comparación **bloque A/bloque B**.

De la relación de veces de incremento o disminución en cada bloque seleccionamos finalmente 49 genes incrementados en la cDNA3.1/N2a frente a $\Delta 56LEF1/N2a$, y 71 genes cuya expresión se reduce en las células cDNA3.1/N2a respecto a las células $\Delta 56LEF1/N2a$ según los criterios utilizados (ver datos adjuntos en el CD anexo).

La comparación del comportamiento de los genes obtenidos en función del tratamiento realizado nos permite discriminar entre: 1) genes que responden a estradiol y a Wnt y que varían en función de LEF1, 2) genes que responden a Wnt3a en función de LEF1 y 3) genes que responden a estradiol y no a Wnt y que dependen de LEF1.

Finalmente, en este listado prestamos atención a aquellos genes cuyo comportamiento encaja con cualquiera de estas tres posibilidades. Así, de los 49 genes que se incrementan en la relación **bloque A/bloque B**, seleccionamos 17 posibles genes y de los 71 que se reducen en la relación **bloque A/bloque B** se seleccionaron 30 de ellos. Algunos de los datos que se seleccionaron finalmente pertenecen a secuencias todavía no conocidas y de ellos se seleccionaron para un análisis posterior aquellos cuya variación era más notable.

Los resultados obtenidos del análisis de los *microarrays* pusieron de manifiesto la existencia de un subgrupo de genes, dentro de los que responden a estradiol, que se inducen en función de la presencia de LEF1 funcional. Además, de ellos, algunos se comportan como lo hacen frente a Wnt3a pero otros son únicamente genes de respuesta a estradiol. Quisimos comprobar el comportamiento de algún gen activado por estradiol y sensible a LEF-1 a nivel de proteína. La confirmación de la variación de alguno de los genes la realizamos mediante *Western Blot* para lo que extendimos los tratamientos a 24 horas con el fin de dejar un tiempo necesario para la acumulación de proteínas.

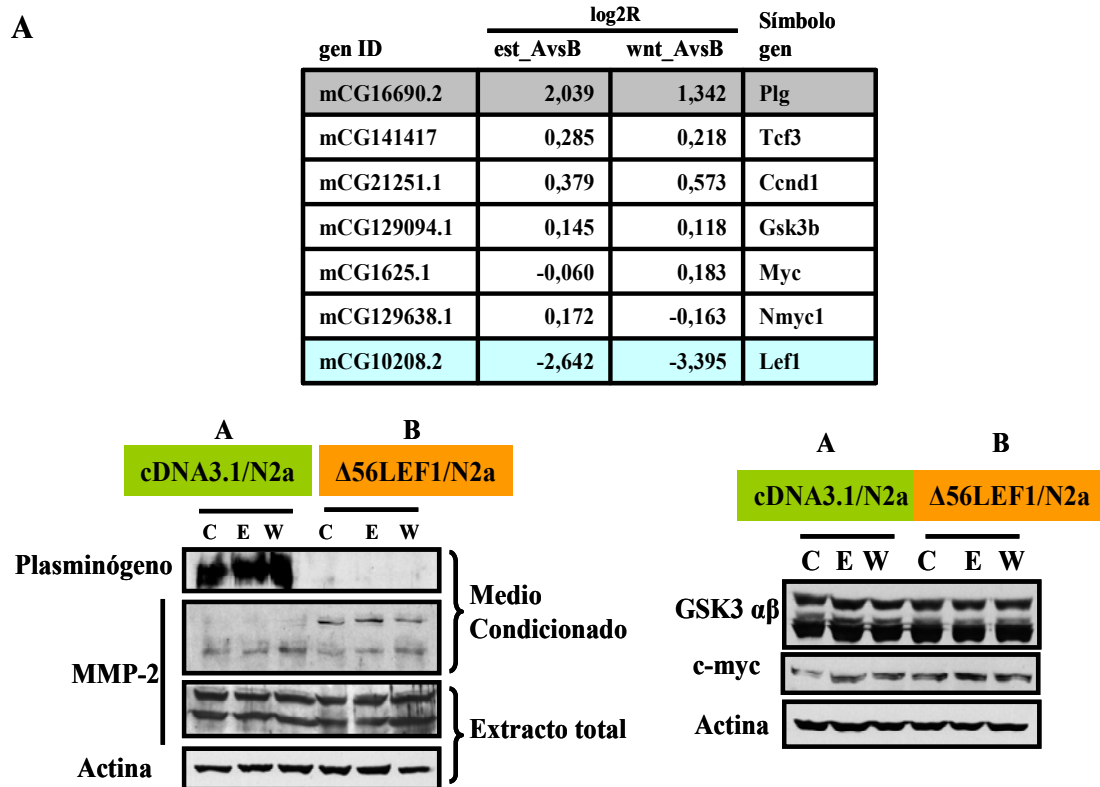


Figura 28 A. Expresión génica en respuesta a estradiol en células N2a control (cDNA3.1/N2a) y en células con expresión estable de Δ56LEF1 (Δ56LEF1/N2a).

En la tabla figuran algunos de los genes analizados en los *microarrays* y sus variaciones entre los dos bloques de células. Se denominó **A** a las células cDNA3.1/N2a y **B** a las células Δ56LEF1/N2a. Los datos se presentan como una relación de la inducción de cada gen obtenida en el bloque de células **A** frente al bloque de células **B**, en forma de log₂R. Se comprobaron también los cambios producidos a nivel de proteína tras tratamientos de 24 horas de duración. [Gene_Symbol: *Plg* (plasminógeno), *Tcf3*, *Ccnd1* (ciclina D1), *GSK3b*, *Myc* y *LEF1*].

Así nuestros datos indican que entre los genes que más varían en la comparación sencilla entre bloques se encuentran plasminógeno, que se encuentra en el medio extracelular con una secreción en torno a cuatro veces mayor en las células cDNA3.1/N2a en comparación con las células Δ56LEF1/N2a (Figura 28 A). Como comparación con otra proteína secretada al medio de cultivo se compararon dichos niveles con la cantidad de la proteína MMP-2. Con el

anticuerpo que reconoce la proteína MMP-2 total, se observan cambios notables entre ambas líneas celulares en la proporción entre la forma proactiva y la forma activa de dicha metaloproteasa. Ésta presenta un nivel de proteína invariable cuando se analiza en los niveles de ARN mensajero y en extracto total celular, sin embargo cuando se estudia su presencia en el medio condicionado de cada bloque de células, la forma pro-activa es más abundante en el caso de las células $\Delta 56\text{LEF1/N2a}$ y menos abundante la forma activa. De los mismos cultivos de los que se recogió el medio extracelular se obtuvieron extractos totales que se analizaron en WB para comprobar la carga de proteína utilizando actina como control de carga.

Se comprobaron también en *western blot* aquellos genes que no varían en los *arrays* y que están implicadas en la ruta de señalización de Wnt o regulados por TCF/ β -catenina. Entre ellos, E-cadherina (Jamora et al. 2003), ciclina D (Shtutman et al. 1999), c-myc (He et al. 1998), LEF1 (Hovanes et al. 2001) o TCF1 (Roose and Clevers 1999).

A continuación, pasamos al estudio comparativo de los genes activados por estradiol en los dos bloques de células (Fig. 28 A y B).

B

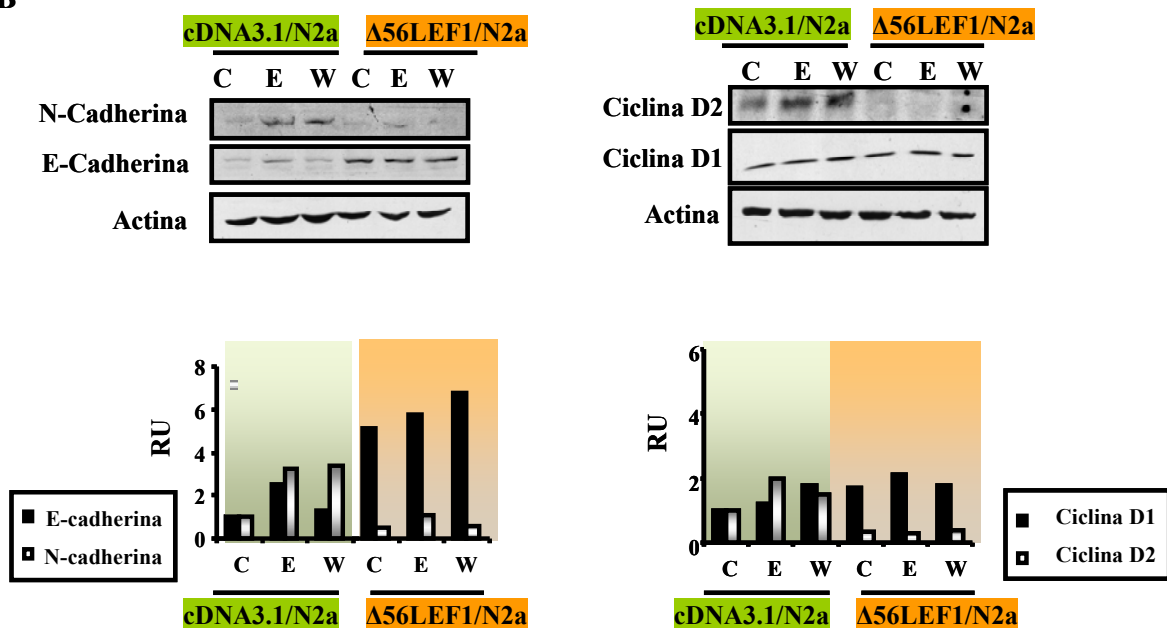


Figura 28 B. El Aumento de N-cadherina y ciclina D2 inducido por estradiol es sensible a la expresión de la forma $\Delta 56\text{LEF1}$. Se recogieron los extractos totales de las células correspondientes al bloque A y bloque B después de un tratamiento de 24 horas con estradiol 100 nM o Wnt3a (20ng/ml). Se analizaron algunos de los genes diana conocidos para la vía Wnt o de respuesta a estrógenos. Estradiol incrementa los niveles de E-cadherina, N-cadherina y ciclina D2 en el bloque de células A. En contraposición, E-cadherina no responde con el tratamiento de Wnt3a en el bloque A. La capacidad que muestra estradiol para regular los niveles de E-cadherina, N-cadherina y ciclina D2 se pierden cuando se expresa $\Delta 56\text{LEF1/N2a}$, bloque B. Los niveles de actina o ciclina D1 permanecen invariables entre los dos bloques de células y con los tratamientos realizados. n=2.

Nos interesaba identificar la existencia de aquellos genes que cumplen las siguientes condiciones: 1) genes que son modificados por estradiol en las células cDNA3.1/N2a (células control) y que, al mismo tiempo, 2) dicha activación se ve afectada con la expresión de $\Delta 56\text{LEF1}$ en las células $\Delta 56\text{LEF1}/\text{N2a}$. Entre dichos genes hemos detectado tres candidatos para una regulación mediada por estradiol dependiente de LEF1 y sobre los cuales profundizar en estudios posteriores: ciclina D2, N-cadherina y E-cadherina si bien su comportamiento es diferente.

Ciclina D2 y N-cadherina. La expresión de estas dos proteínas se ve aumentada en las células cDNA3.1/N2a tras los tratamientos con estradiol y Wnt3a. En las células $\Delta 56\text{LEF1}/\text{N2a}$ se pierde esa regulación mediada tanto por estradiol como por Wnt3a. En contraposición, los niveles de ciclina D1 se mantienen intactos tanto con los tratamientos como en la comparación entre los dos subtipos de células. Para comparación de N-cadherina con otra isoforma de cadherinas, **E-cadherina**, analizamos sus niveles de expresión en las mismas condiciones. En células cDNA3.1/N2a, la adición de estradiol provoca un aumento en la cantidad de E-cadherina que no se observa en el caso del tratamiento con Wnt3a. Sin embargo, la expresión de $\Delta 56\text{LEF1}$ induce una desregulación de este promotor elevando notablemente los niveles de E-cadherina independientemente del tratamiento realizado.

En resumen, encontramos y validamos una serie de genes regulables por estradiol que son sensibles a LEF1.

7. Efecto de estradiol sobre la actividad MAPK.

Puesto que existen datos previos en la bibliografía de una activación de esta vía en respuesta a estradiol que ocurre a tiempos cortos otros tipos celulares {Migliaccio, 1996 #219}, quisimos comprobar qué sucedía en la línea neuronal N2a en los tratamientos con estradiol respecto a la posible activación de ERK1/2, analizando la variante difosforilada, en los residuos de Thr²⁰² y Tyr²⁰⁴, que se correlacionan con la activación de ERK1/2. Así, nuestros datos indican que a tiempos cortos del tratamiento de estradiol, 10 minutos, se observa un incremento en P-ERK que disminuye rápidamente alcanzando niveles similares al control a los 20 min. Ocurre de manera más tardía un incremento en la fosforilación del residuo de Thr³⁰⁸ de Akt, indicativo de su activación, en torno a los 20 minutos del tratamiento y que es mantenido hasta los 90 minutos, como se puede observar en la figura 29.

Para comprobar en qué medida la activación de ERK y de Akt podría ser de interés para nuestros estudios posteriores analizamos si el aumento en la fosforilación de ERK y Akt en el

residuo de Thr³⁰⁸ puede bloquearse con el antagonista de los receptores de estrógenos, ICI 182,780. Como se muestra, con el antagonista de ERs previo al tratamiento de estradiol, podemos bloquear el incremento en la activación de Akt (P-Thr³⁰⁸) pero no la activación de las proteínas ERK 1/2 (Fig. 29) que presentan una fosforilación durante más tiempo en presencia de la combinación ICI y estradiol observándose un incremento de P-ERK a los 30 minutos.

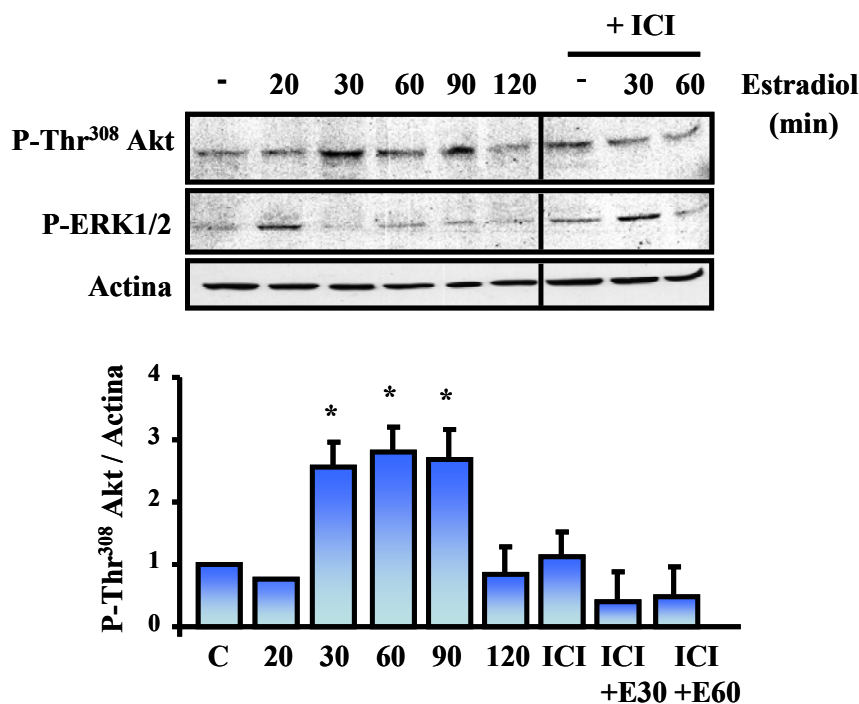


Figura 29. Activación de ERK y Akt en respuesta a estradiol en neuroblastoma N2a. Se trataron las células con estradiol 100nM y se analizó a tiempos cortos la activación de la vía MAPK y de Akt mediante la detección de cambios en su fosforilación. Se produce un incremento inicial en la activación de Erk1/2 en los primeros 20 minutos del tratamiento y que de forma rápida es de nuevo reducida al nivel del control. La adición de estradiol produce un aumento más tardío en torno a los 30 min en la fosforilación de Thr³⁰⁸Akt. El bloqueo de los receptores de estrógenos con ICI 182,780 10 μ M sólo reduce la fosforilación de Akt pero no la que tiene lugar en Erk1/2. Los datos se obtuvieron a partir de n=3 experimentos independientes. * $p \leq 0,05$.

8. Papel de estradiol sobre PI3K-Akt-GSK3 en desarrollo neuronal.

Como comparación de la implicación en la formación del axón en neuronas en cultivo de dos de las grandes rutas examinadas brevemente en este trabajo y moduladas por estradiol (MAPK y PI3K-Akt-GSK3), realizamos el bloqueo de la enzima PI3K con LY29002 y el bloqueo de MAPK con el inhibidor U0126 en neuronas control y tratadas durante 3 días con estradiol 50 nM. Las neuronas mantenidas durante 3 días con LY29004 no presentan axón sin embargo sí existe, idéntico al control, con la inhibición de MAPK (Fig. 30), como se había descrito en trabajos previos. La adición de estradiol a las neuronas tratadas con MAPK no

promueve la extensión del axón en los 3 primeros días del cultivo, manteniéndose en una longitud idéntica al control sin tratar y a las neuronas con el inhibidor de MAPK. Aunque la activación de MAPK se ha observado en diferentes tipos celulares y hemos visto una respuesta rápida a estradiol en las células N2a, no parece ser dependiente de los ERs y como se ha indicado anteriormente no es bloqueada con el uso del antagonista ICI 182,780 haciendo complicado su análisis a pesar de parecer importante para la extensión axonal. Aunque la activación de la vía de MAPK podría tener una implicación en elongación axonal en estadios posteriores no parece ser imprescindible para la formación y elongación axonal en condiciones basales durante las primeras fases del desarrollo axonal.

Sobre un estado de inhibición de PI3K no se consigue el desarrollo del axón (ni el inicio de la formación del mismo) ante el tratamiento de estradiol 50 nM. Sobre la morfología neuronal, existen numerosos datos que determinan a la ruta de señalización PI3K-Akt-GSK3 un papel esencial. La inhibición de la actividad de PI3K impide la aparición de axón en neuronas de hipocampo a 3 DIV (Fig. 30 y 31) y supone muerte neuronal pasados 7 días en cultivo. Sobre una situación de inhibición de PI3K-Akt, la adición de estradiol no consigue promover la aparición de axón, a concentraciones a las que sí vemos efecto positivo en la morfología neuronal (Fig. 30 y 31).

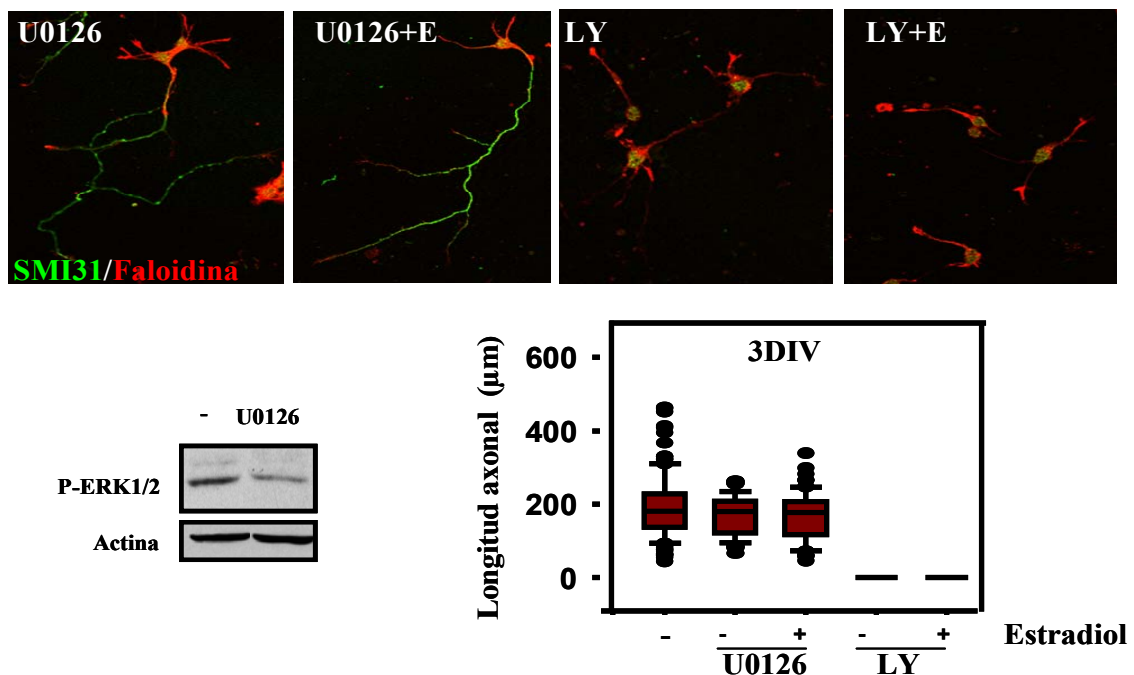


Figura 30. Inhibición de MAPK o PI3K y su implicación en el desarrollo axonal.

Se trataron las neuronas desde el plaqueo hasta 3 DIV o 7DIV con U0126 (10 µM) o LY (25 µM) sólo o combinados con un tratamiento de estradiol 50 nM/día.

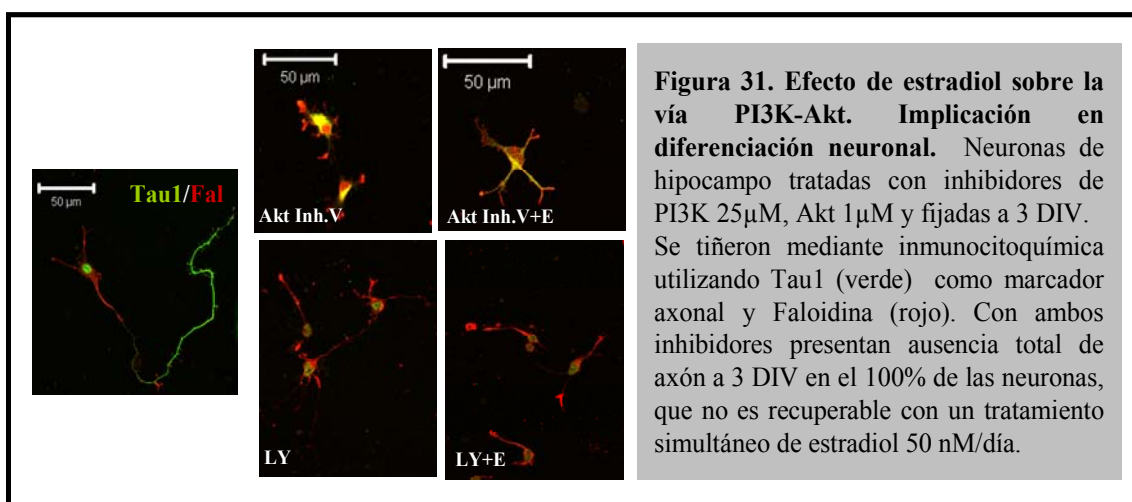
Se tiñeron las neuronas mediante inmunocitoquímica para estudiar la presencia/ausencia de axón y su longitud en cada caso. En la gráfica se muestra la cuantificación de la longitud axonal en µm de los datos procedentes de n=3 experimentos independientes, 100 neuronas contabilizadas por ensayo. El wetern blot muestra la disminución de la fosforilación de ERK1/2 con el tratamiento de U0126 en extractos totales de las neuronas a 3 DIV.

En la figura 31 se muestra el resultado obtenido con la inhibición de Akt en la morfología neuronal y la ausencia de efecto positivo de la adición de estradiol sobre las neuronas tratadas con el inhibidor de AktV y mantenidas durante 3 días en cultivo.

8.1. Efecto de estradiol sobre la inhibición de Akt en elongación axonal.

La ruta de PI3K/Akt/GSK3 desempeña un importante papel en la elongación axonal a diferentes niveles. Por una parte, Akt modula la actividad de GSK3, que resulta determinante en la formación del axón en neuronas de hipocampo. La actividad de GSK3 debe ser regulada durante todo el proceso, siendo imprescindible en la determinación del axón y su desarrollo inicial. Entre los sustratos de GSK3 se encuentran proteínas de unión a microtúbulos o β -catenina entre otros.

Además tal y como se ha indicado anteriormente, la interacción de los receptores de estrógenos con la vía de señalización PI3K-Akt. Esta interacción induce un aumento en la actividad de Akt. Hemos comprobado que, en cultivos neuronales, la activación de Akt con los tratamientos de estradiol tiene lugar tanto en el residuo de Ser⁴⁷³ como en el de Thr³⁰⁸. Además, esta activación es bloqueable en parte con la incubación previa del compuesto ICI, determinando la función de ERs en dicha activación.



A través de la interacción de ERs con la vía de señalización de PI3K-Akt podrían activarse en principio, de una manera hipotética, aquellas rutas Akt dependientes. La actividad de Akt recae además de sobre GSK3, sobre otras proteínas de interés para el desarrollo neuronal entre ellas, regula la ruta mTORC1/S6K/S6 (Morita and Sobue 2009; Park et al. 2008) que resulta estar regulada por estradiol en las neuronas de hipocampo al menos durante los primeros días de su desarrollo en cultivo como se ha descrito en la sección 5 de resultados.

TERCERA PARTE:**CONTROL DE LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN MEDIADAS POR ESTRADIOL SOBRE LA MORFOLOGÍA NEURONAL.**

Nuestros datos iniciales indicaban que la elongación axonal y dendrítica necesita los receptores de estrógenos activos, tanto α como β . Nuestro interés se centró en tratar de entender de qué manera el bloqueo de esta función era dependiente de la actividad de la señalización citoplásmica.

Una primera aproximación para poder discriminar qué elementos podrían estar situados “por debajo de” la señalización de los receptores es comprobar si podemos revertir el efecto negativo de la inhibición de los receptores usando elementos modificados de las rutas de señalización que hemos descrito.

Apoyándonos en las dianas de Akt modificadas por estradiol nos centramos para este análisis en: la estabilización de β -catenina por inhibición de GSK3 y en la activación de mTORC1 por inhibición de TSC1/TSC2, por los papeles que ambas proteínas juegan en desarrollo neuronal y que han sido descritos recientemente.

Para estos experimentos analizamos la morfología neuronal a 3DIV dado que en este estadio el efecto de ICI es claro sobre la longitud de axón.

8. Efecto de la sobreexpresión de β -catenina en la longitud axonal regulada por estrógenos.

Como se ha descrito en el apartado anterior, estradiol regula los niveles de β -catenina en neuronas de corteza e hipocampo modulando su actividad, por lo que analizamos en primer lugar, el efecto de la función de β -catenina sobre la morfología neuronal.

Para ello neuronas de hipocampo fueron transfectadas/electroporadas con los plásmidos conteniendo la proteína intacta (β -catenina wt), o como un plásmido que expresa la forma mutada de β -catenina, serina 33 por tirosina (S33Y β -catenina).

Este plásmido, como se describe en el apartado anterior, genera una transcripción dirigida por β -catenina elevada de manera constitutiva (Fig. 25 A y Fig. 32 C). Se introdujo de manera simultánea un plásmido de expresión de la proteína verde fluorescente (*GFP*) como se indica en *Materiales y Métodos* para contabilizar aquellas neuronas co-transfectadas.

Así, analizando mediante *western blot* lisados de las células transfectadas con estas construcciones podemos comprobar que proteínas reguladas por el complejo TCF/ β -catenina,

como Axina 2, aparecen aumentadas indicándonos que la construcción se expresa de manera eficiente en neuronas de corteza (Jho et al. 2002; Lustig et al. 2002; Yan et al. 2001).

En paralelo se llevaron a cabo experimentos de electroporación análogos en neuronas de hipocampo que fueron fijadas y teñidas con anticuerpos específicos del compartimento axonal (SMI31) transcurridas 72h desde su cultivo. Las neuronas transfectadas presentan una morfología similar a las neuronas control (Figura 32 A).

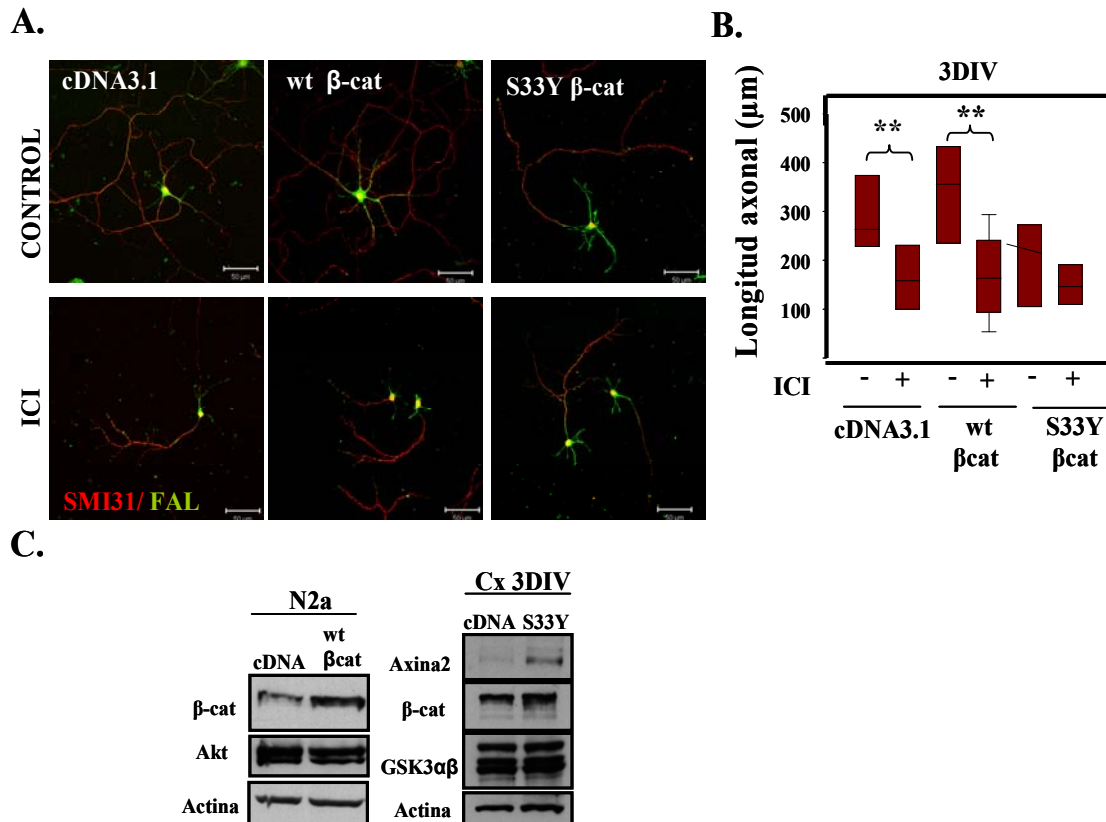


Figura 32. Efecto de la expresión de β-catenina en neuronas de hipocampo sobre la elongación axonal. A) Se electroporaron las neuronas para introducir los plásmidos de expresión S33Y-βcat y wt-βcat y se fijaron las células a los 3 días en cultivo. Para medir la longitud axonal se marcaron las neuronas con SMI31 (P-MAP1B) utilizando un secundario acoplado a un fluoróforo azul (Alexa 647), en la foto mostrado en rojo, y para ver la morfología general de las mismas se realizó una tinción de actina polimerizada (Faloidina). Se cuantificaron únicamente las neuronas positivas para GFP. B) En la gráfica se muestra la longitud media axonal expresada en μm de las diferentes condiciones. En todas ellas, la adición de ICI reduce notablemente la longitud. Los datos proceden de n=3 experimentos independientes y de 100 neuronas contabilizadas/repetición. C) Comprobación por *western blot* de la expresión de los plásmidos utilizando anticuerpos anti-β catenina, Axina 2 (como gen expresado en respuesta a actividad transcripcional de β-catenina). Los niveles de actina, Akt o GSK3 permanecen invariables en ambas condiciones.

Sin embargo, es interesante destacar que la sobre-expresión de S33Y- β catenina resulta en un menor desarrollo dendrítico que también está asociado a una menor longitud media del axón en neuronas procedentes de hipocampo.

Como se observa en los datos cuantitativos que indican la longitud axonal en la sobre-expresión de β -catenina *wt* o mutada, el tratamiento de ICI 182,780 causa un idéntico retardo morfológico comparado al producido en neuronas que sobre-expresan un plásmido vacío como control (cDNA3.1) [Longitud media axonal+desviación estándar: comparación entre **cDNA3.1 C**: $312,44 \pm 32 \mu\text{m}$ y **cDNA3.1+ICI**: $133,34 \pm 33 \mu\text{m}$, frente a **wt- β cat**: $411 \pm 40 \mu\text{m}$ y **wt- β cat+ICI**: $172,5 \pm 28,4 \mu\text{m}$ y frente a **S33Y- β cat**: $250,2 \pm 28 \mu\text{m}$, **S33Y- β cat+ICI**: $156,9 \pm 22,8 \mu\text{m}$]. (Figura 35 B).

9. Análisis de la implicación de la actividad Rheb/mTORC1 en el desarrollo neuronal mediado por ERs.

En segundo lugar, nos centramos en la implicación de Akt-mTORC1 en el desarrollo neuronal basándonos en la modulación de esta vía mediante ER en neuronas descrito previamente.

Para estudiar qué papel puede ejercer la activación de Akt/mTORC1/S6K en el crecimiento axonal decidimos bloquear esta vía con rapamicina, para analizar en primer lugar el efecto del bloqueo de la activación de mTORC1 en las neuronas de hipocampo en cultivo. La rapamicina se añadió desde el primer día del cultivo manteniéndose hasta 7 días suministrada en dosis de 20nM/día a neuronas de hipocampo y de corteza.

Este tratamiento de rapamicina genera una disminución en el ritmo de crecimiento del axón medido a los 3 DIV (figura 33, comparación de C: $222,4 \pm 13 \mu\text{m}$ frente a $120 \pm 6 \mu\text{m}$).

Para determinar si estradiol era capaz de revertir el efecto de la inhibición de mTORC1, decidimos primero inhibir la actividad de mTORC1 con rapamicina y a continuación estimular con estradiol a una concentración de 50 nM durante 3 días.

Las células fueron tratadas y teñidas con marcadores de citoesqueleto. Nuestros datos, que se muestran en la figura 33, indican que el bloqueo de la actividad de mTORC1 incapacita a estradiol el efecto de aumentar la elongación axonal. [Longitud axonal media + desviación estándar: C $222,4 \pm 13 \mu\text{m}$, **Rapa** $120 \pm 6 \mu\text{m}$ frente a **Rapa+E** $126,7 \pm 6,4 \mu\text{m}$; o a **7DIV** la comparación entre **Rapa**: $242,34 \pm 20,83 \mu\text{m}$ frente a **Rapa+E**: $287,81 \pm 25,83 \mu\text{m}$].

En la gráfica (Fig. 33 B) se representa la longitud axonal en cada caso y las diferencias estadísticas entre los grupos con valor significativo. No existe diferencia significativa entre el grupo de neuronas tratadas con rapamicina y tratadas con la combinación rapamicina+estradiol. Se cuantificaron también las longitudes de las dendritas tras el tratamiento con rapamicina (Fig. 33 B), sin embargo el bloqueo de la actividad de mTORC1 no modifica este parámetro como muestran los datos correspondientes a las longitudes medias y sus

desviaciones representados en la gráfica de la figura 36. [Longitudes dendríticas, +desviación estándar: a 3 DIV comparación entre C: $24,5 \pm 1 \mu\text{m}$, E: $24,48 \pm 1,4 \mu\text{m}$, Rapa: $21,3 \pm 1 \mu\text{m}$ y Rapa+E: $19,19 \pm 0,66 \mu\text{m}$].

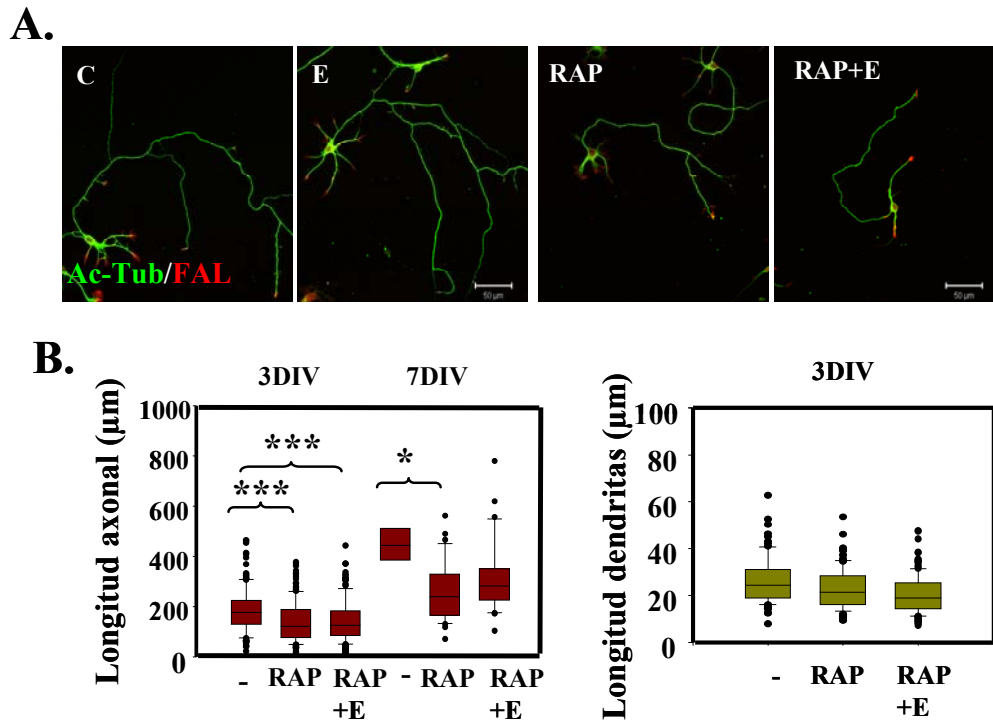


Figura 33. Reducción de la longitud axonal con la adición de rapamicina. Las neuronas fueron tratadas con rapamicina 20nM desde el plaqueo hasta el día 3 *in vitro*. La adición de estradiol se realizó en paralelo sobre neuronas control y tratadas con rapamicina. **A)** Imagen representativa de neuronas tratadas con rapamicina y en combinación con estradiol fijadas a día 3 del cultivo y marcadas con anticuerpo anti-tubulina acetilada (verde) y con Faloidina (rojo). En ambos casos se observa un axón menor en longitud. **B)** Las gráficas corresponden a la cuantificación de las longitudes axonales (izquierda) en neuronas control, tratadas con rapamicina y con la combinación rapamicina +estradiol (a 3 DIV y 7 DIV) *** $p \leq 0,001$, * $p \leq 0,5$ y a la cuantificación de las longitudes de dendritas a día 3 del cultivo (derecha), no observándose ninguna diferencia significativa entre los datos obtenidos. Los datos proceden de $n=3$ experimentos independientes y 100 neuronas contabilizadas/ repetición.

Como método alternativo de analizar la influencia de la vía activada por estradiol sobre la elongación axonal, comprobamos si sobre la inhibición de los receptores, usando el antagonista ICI, la sobre expresión de elementos de esta vía podría revertir dicha inhibición.

Teniendo en cuenta que el tratamiento con ICI disminuye la fosforilación de S6 (ver Fig. 29 A) una posibilidad sencilla sería analizar si la sobreexpresión de la quinasa responsable podría revertir algunos de los efectos observados.

Para conseguir una activación de S6K sobre-expresamos dos plásmidos: uno de ellos con efecto directo sobre mTORC1, Rheb, y el segundo la propia proteína S6K, uno de los

efectores de mTORC1, tanto en su forma original como una forma mutada que se detallan a continuación.

9.1. Sobreexpresión de Rheb activo constitutivo y de S6K.

Para analizar el efecto de la activación de esta ruta de señalización introdujimos en las neuronas por electroporación en primer lugar un plásmido que expresa la proteína S6K y en segundo lugar un plásmido que expresa Rheb en su forma activa constitutiva (mutación Q64L) (Jiang and Vogt 2008) en co-transfección ambos con el plásmido de expresión de GFP siguiendo el mismo procedimiento que para en el apartado anterior.

Se comprobó en primer lugar la expresión y funcionalidad de los plásmidos en activación de la vía en neuronas primarias o en células N2a. Recogimos los extractos totales y analizamos las proteínas S6K, la fosforilación de S6K dependiente de mTORC1 (P-S6K), la proteína ribosomal S6 y su fosforilación (P-S6) (Fig. 34 C).

En la figura se muestra la imagen representativa de las neuronas de hipocampo a los 3 días de expresión de dichos plásmidos en situación control o tras el tratamiento de ICI 182,780. Como se observa en las imágenes, la expresión de S6K en las neuronas da lugar a axones más cortos con diferencia significativa respecto al control. Sobre estas neuronas, la adición de ICI 182,780 genera una apariencia idéntica a la de las neuronas control (cDNA3.1) tratadas con ICI 182,780 (Figura 34 B) [Longitud media axonal, μm +desviación estadística: comparación entre **cDNA3.1:** $293,84 \pm 14,92 \mu\text{m}$, **cDNA3.1+ICI:** $137,2 \pm 8 \mu\text{m}$ frente a **S6K:** $225,7 \pm 12,15 \mu\text{m}$, **S6K+ICI:** $150,47 \pm 7,8 \mu\text{m}$].

Sin embargo, la expresión del plásmido constitutivamente activo de Rheb (RhebQ64L) da lugar a unas neuronas con una longitud axonal similar a las de neuronas transfectadas con el plásmido control. El tratamiento con ICI sobre neuronas RhebQ64L resulta en un fenotipo diferente a las controles contabilizando una diferencia significativa en la longitud axonal. [Longitud media axonal +desviación estándar: **Rheb:** $355,97 \pm 21,4 \mu\text{m}$ frente a **Rheb+ICI:** $301,6 \pm 28 \mu\text{m}$]. Son visibles también las diferencias en las longitudes de las dendritas, identificadas como aquellas neuritas SMI-31 negativas [Longitud de dendritas, +desviación estándar: **cDNA3.1:** $38,64 \pm 2,8 \mu\text{m}$ frente a **cDNA3.1+ICI:** $18,14 \pm 1,6 \mu\text{m}$, **S6K:** $32,09 \pm 1,63 \mu\text{m}$ frente a **S6K+ICI:** $19,66 \pm 0,88 \mu\text{m}$ y **Rheb:** $33,32 \pm 2,1 \mu\text{m}$ frente a **Rheb+ICI:** $29,83 \pm 1,7 \mu\text{m}$].

La expresión de Rheb, pero no la de S6K, supone un impedimento, o reversión parcial, del bloqueo morfológico creado por el antagonista de receptores de estrógenos (Figura 34 B).

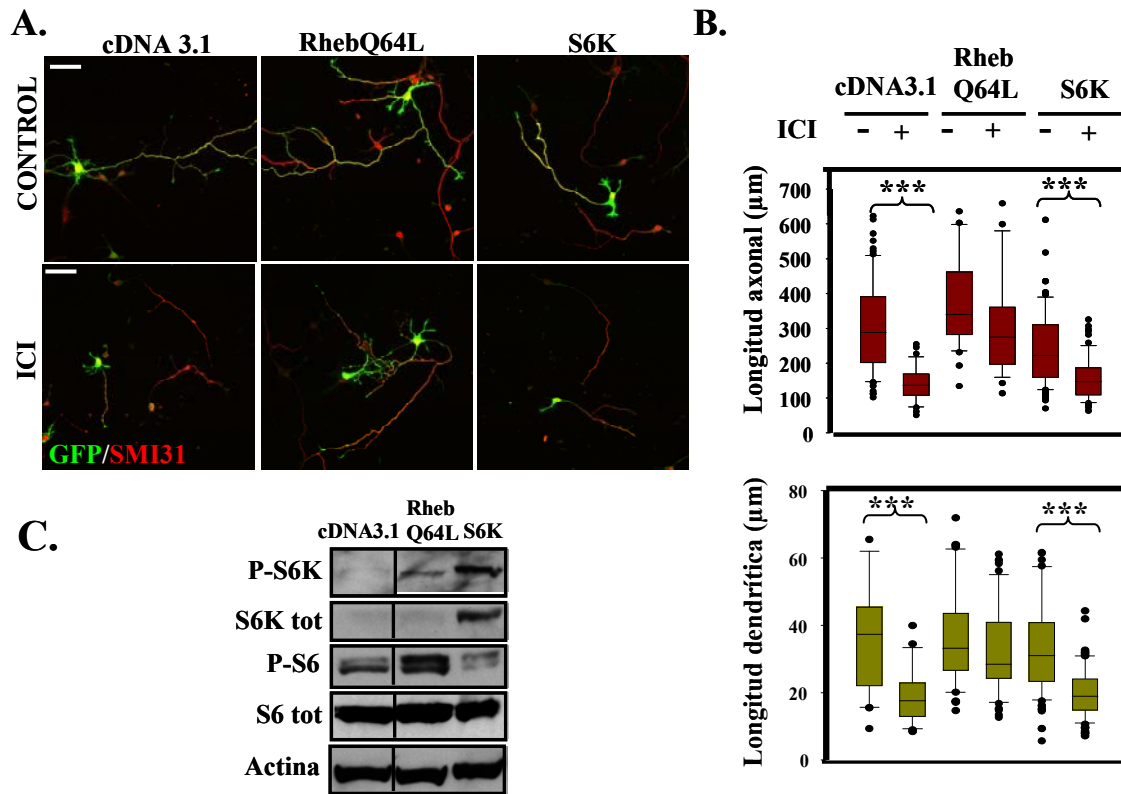


Figura 34. Sobreexpresión en neuronas de hipocampo de S6K y la forma constitutivamente activa de Rheb, RhebQ64L. A) La expresión de RhebQ64L impide el efecto de ICI 182,780. Las neuronas electroporadas con estos plásmidos junto con el plásmido de expresión de GFP (en relación 1:6) se trataron con ICI 5μM y se fijaron tras 3 DIV. Se contabilizaron solamente las neuronas GFP positivas y se marcaron mediante inmunocitoquímica con anti-GFP y SMI-31 (marcador axonal). En las neuronas controles y las que expresan la proteína S6K la adición de ICI genera una morfología reducida, mientras que esto no ocurre en las neuronas que expresan la proteína RhebQ64L. **B) Cuantificación de la longitud axonal (arriba) y de las dendritas (abajo).** Los datos mostrados proceden de n=3 experimentos independientes en los que se contabilizaron 100 neuronas por experimento. ***p≤0,001. **C) Comprobación de la expresión de los plásmidos introducidos (S6K, RhebQ64L) en extractos totales de N2a analizados por WB** utilizando anticuerpos específicos que reconocen S6K total, S6K fosforilada en los residuos de activación, S6 total y S6 fosforilada en los sitios diana de la proteína S6K. La expresión de S6K y de RhebQ64L genera un incremento en la fosforilación de S6 reflejo de la actividad de S6K, de la cual se observa también un ligero aumento en su fosforilación.

Por otra parte, como se observa en la figura 35, la adición de rapamicina en neuronas que sobre-expresan la forma activa constitutiva de Rheb crea una clara disminución de la longitud axonal [Fig 35 B. Longitud media axonal: **Rheb**. 355,97± 21μm frente a **Rheb+Rapa**: 116,67± 8,25μm] similar a la que ocurre en neuronas control [Longitud media axonal: **cDNA3.1**: 293,84± 14,92 μm frente a **cDNA3.1+Rapa**:160,52± 8,57 μm] e incluso en

neuronas con sobre-expresión de S6K [**S6K** : $225,72 \pm 12,15 \mu\text{m}$ frente a **S6K+Rapa**: $184,49 \pm 9,95 \mu\text{m}$]. En todos los casos, la reducción ocurre únicamente sobre los axones y no sobre las dendritas que no presentan ninguna modificación significativa [Fig 38. Longitud media de dendritas, μm : **cDNA3.1** ($27,7 \pm 1,52$), **cDNA3.1+Rapa** ($28,74 \pm 1,19$), **Rheb** ($31,23 \pm 2,98$), **Rheb+Rapa** ($30,89 \pm 3,17$), **S6K** ($33,83 \pm 2,3$), **S6K+Rapa** ($31,19 \pm 2,86$)].

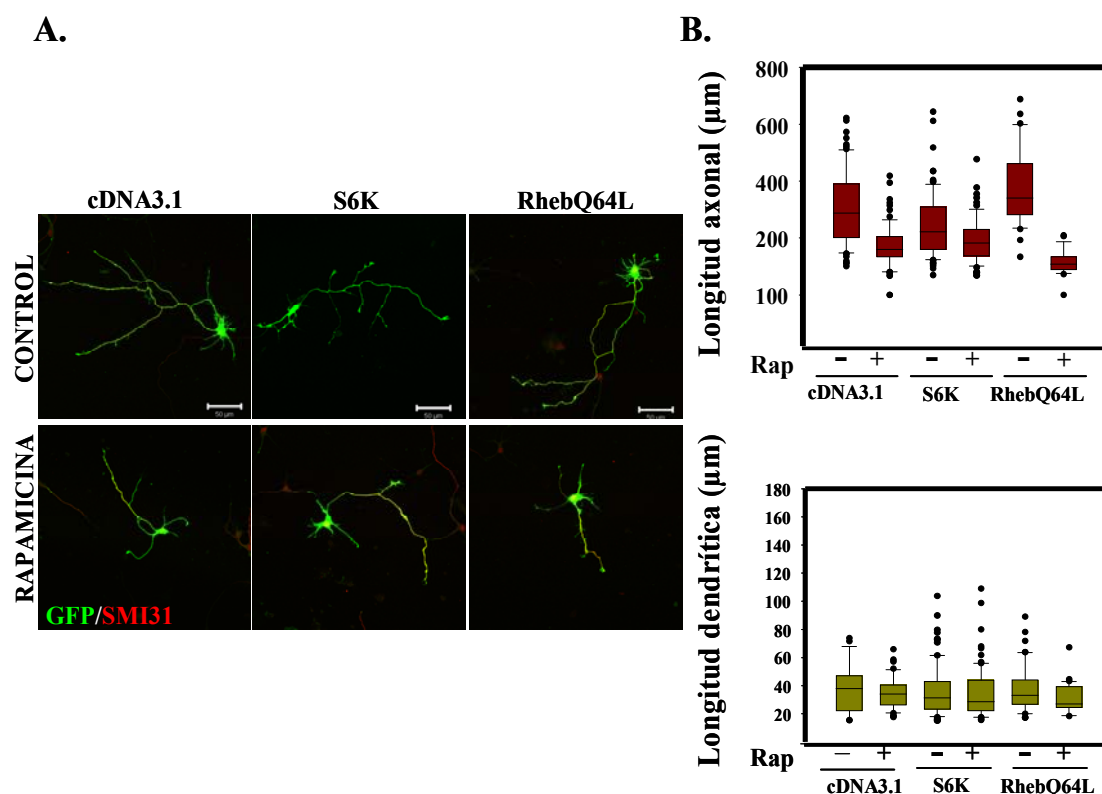


Figura 35. Tratamiento con rapamicina en neuronas de hipocampo que sobre-expresan S6K y RhebQ64L. A) Las neuronas electroporadas con S6K y RhebQ64L o cDNA3.1 vacío en combinación con un plásmido de expresión de GFP los tres, se trataron con rapamicina 20nM durante 3 días y se fijaron para analizar mediante inmunocitoquímica tiñéndose con anti-GFP (verde) y SMI31 (rojo). Se analizaron únicamente las neuronas GFP positivas. Se observa una disminución clara en la longitud axonal debido a la rapamicina en situación control y en neuronas-RhebQ64L pero menor en las neuronas que expresan S6K. **B)** Cuantificación de la longitud de axones (arriba) y dendritas (abajo) en cada condición. La longitud dendrítica no presenta ningún cambio significativo, pero sí la axonal, si bien es menor la reducción observada en las neuronas que expresan S6K. $n=3$ (100 neuronas/repetición) **** $p=0$, * $p \leq 0,5$.

De los datos obtenidos en relación al posible efecto de la activación de la vía de mTORC1 que ocurre en neuronas de hipocampo de manera dependiente de ERs, hemos visto que parecería tener un papel esencial la actividad de la proteína Rheb por su capacidad de revertir el efecto que tiene sobre la morfología la presencia de ICI al menos durante las primeras fases de la diferenciación neuronal.

10. Implicación de la dinámica de actina en el crecimiento de neuritas mediado por ERs.

Datos recientes indican que el estradiol puede activar elementos que regulan el citoesqueleto de actina, tales como cdc42 o proteínas asociadas a actina como moesin (Sanchez et al. 2009). Uno de los efectos más llamativos de la morfología de las neuritas obtenida tras el tratamiento de ICI es una mayor “densidad” de actina polimerizada en los extremos en crecimiento sobre un área mayor.

El análisis de las neuronas fijadas y teñidas con Faloidina pone de manifiesto que la actina polimerizada presenta una distribución diferente tras el tratamiento con ICI. Mientras que en neuronas control la actina se distribuye de manera filiforme en los denominados filopodios, en las neuronas tratadas con ICI la F-actina terminal se distribuye de una manera más compacta. Para comprobar si existen diferencias medimos el área ocupada por F-actina de mayor intensidad en los extremos neuríticos. Como vemos en la figura 36, el área de F-actina en los extremos en crecimiento se ve incrementada notablemente en las neuronas tratadas con ICI [Valor relativo de área+ desviación estadística: C: $20,9 \pm 1,4 \mu\text{m}$, E: $22,8 \pm 1,8 \mu\text{m}$ frente a ICI: $27,13 \pm 0,7 \mu\text{m}$].

El aspecto de estas terminaciones junto con la menor longitud que presentan parece corresponder a una menor dinámica de polimerización/despolimerización de actina.

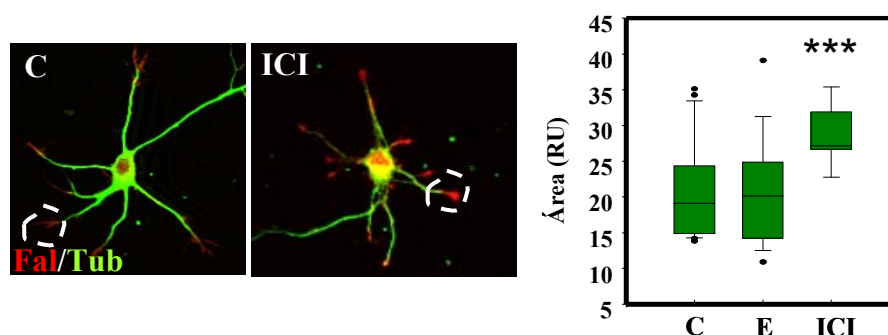


Figura 36. El tratamiento con ICI 182,780 da lugar a un aumento del área de F-actina en los extremos de crecimiento en los axones y dendritas de hipocampo en cultivo. Las neuronas se trataron durante 3 DIV con ICI 182,780 5 μM , se fijaron y marcaron utilizando Faloidina (roja) y tubulina (verde). El tratamiento con ICI genera acúmulos de F-actina en los extremos en crecimiento ocupando ésta un área mayor respecto a neuronas control y a neuronas tratadas con estradiol 50 nM. Las imágenes obtenidas se trataron para la cuantificación del área de lo extremos ricos en F-actina con el programa ImageJ, en la imagen se muestra la disposición en dendritas. Las cuantificaciones del área rica en F-actina se muestran en la gráfica obteniendo un claro aumento del área de F-actina tras el tratamiento de ICI 182,780. N=3 experimentos independientes. La gráfica muestra datos procedentes del análisis de 50 neuronas/ condición. (***) $p \leq 0,001$.

Nos propusimos analizar en qué medida la polimerización de actina podría influenciar la axonogénesis mediada por estradiol.

Para estudiar en qué medida es importante la dinámica de actina para el bloqueo de extensión neurítica observado con el antagonista de los receptores de estrógenos, tratamos de comprobar si la inhibición de la quinasa activada por RhoA (ROCK1) con el compuesto Y27632, o la despolimerización de actina, con Citocalasina D, tienen la capacidad de modificar dicha reducción en la longitud axonal.

Las neuronas así tratadas se fijan y se tiñen con el marcador axonal SMI31. Las longitudes de los axones se determinaron en cada tratamiento. Como se observa en la figura 37, la combinación de ICI con citocalasina D provoca una menor longitud en las extensiones neuronales [**CitoD**: $109 \pm 8,3 \mu\text{m}$, **CitoD+E**: $137,9 \pm 9,5 \mu\text{m}$, **CitoD+ICI**: $93,23 \pm 5 \mu\text{m}$]. Sin embargo, la combinación del compuesto Y27632 e ICI añadidos también desde el primer día del cultivo muestra una longitud axonal mayor, cuyo valor medio presenta una longitud similar a la de neuronas control tratadas únicamente con Y27632 aun en presencia de [**Y27632**: $307,71 \pm 14,79 \mu\text{m}$ vs **Y27632+ICI**: $343,27 \pm 15,8 \mu\text{m}$].

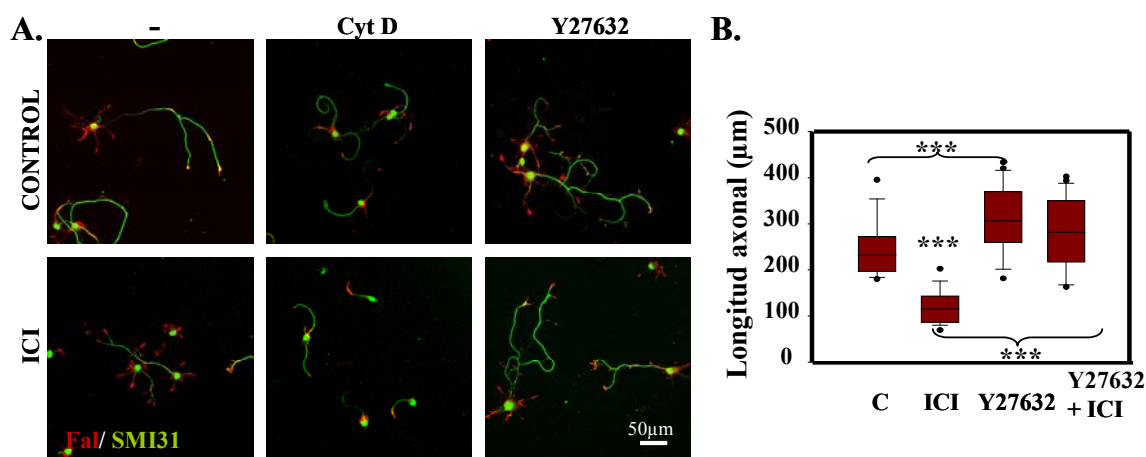


Figura 37. La inhibición de RhoK permite la elongación axonal aun en presencia de ICI 182,780. A) Las neuronas de hipocampo se trataron con Citocalasina D ($1\mu\text{M}$) o con Inhibidor de RhoK (Y27632, $1\mu\text{M}$) desde el plaqueo hasta 3 DIV. Se fijaron y marcaron mediante inmunocitoquímica utilizando para el marcaje Faloidina (rojo) y SMI31 (verde). La morfología obtenida con la adición de Citocalasina D se reduce con la combinación de ICI, mientras que la adición de Y27632 favorece la extensión axonal incluso en presencia de ICI 182,780. B) Los datos obtenidos de los conteos de las longitudes axonales de cada tratamiento se muestran en la gráfica así como las diferencias estadísticas entre los tratamientos. Los datos proceden de $n=3$ experimentos independientes (100 neuronas/experimento). Se observa un claro incremento en la longitud axonal de las neuronas tratadas con ICI cuando es añadido el compuesto Y27632. *** $p \leq 0,001$.

Por último quisimos determinar si con la inhibición de RhoK podemos revertir la reducción de la morfología observada tras la supresión de la isoforma $\text{ER}\alpha$ o de la de $\text{ER}\beta$.

Para ello, electroporamos las neuronas con las construcciones de interferencia de cada isoforma indicadas en el apartado 1 y cuyo efecto en morfología se detalla en el apartado 8 de

esta sección. Además de la interferencia de ER α y ER β , tratamos las neuronas electroporadas con el compuesto Y27632, que se añadió desde el primer día del cultivo de las neuronas. De la supresión de α y β , como se ha expuesto en el primer apartado de los resultados, tiene un mayor efecto en la reducción de la longitud axonal la interferencia de la isoforma ER β , y de las construcciones probadas para la isoforma ER α observamos un efecto más fuerte con la construcción “176” en comparación con la construcción “201”(Fig. 37 A).

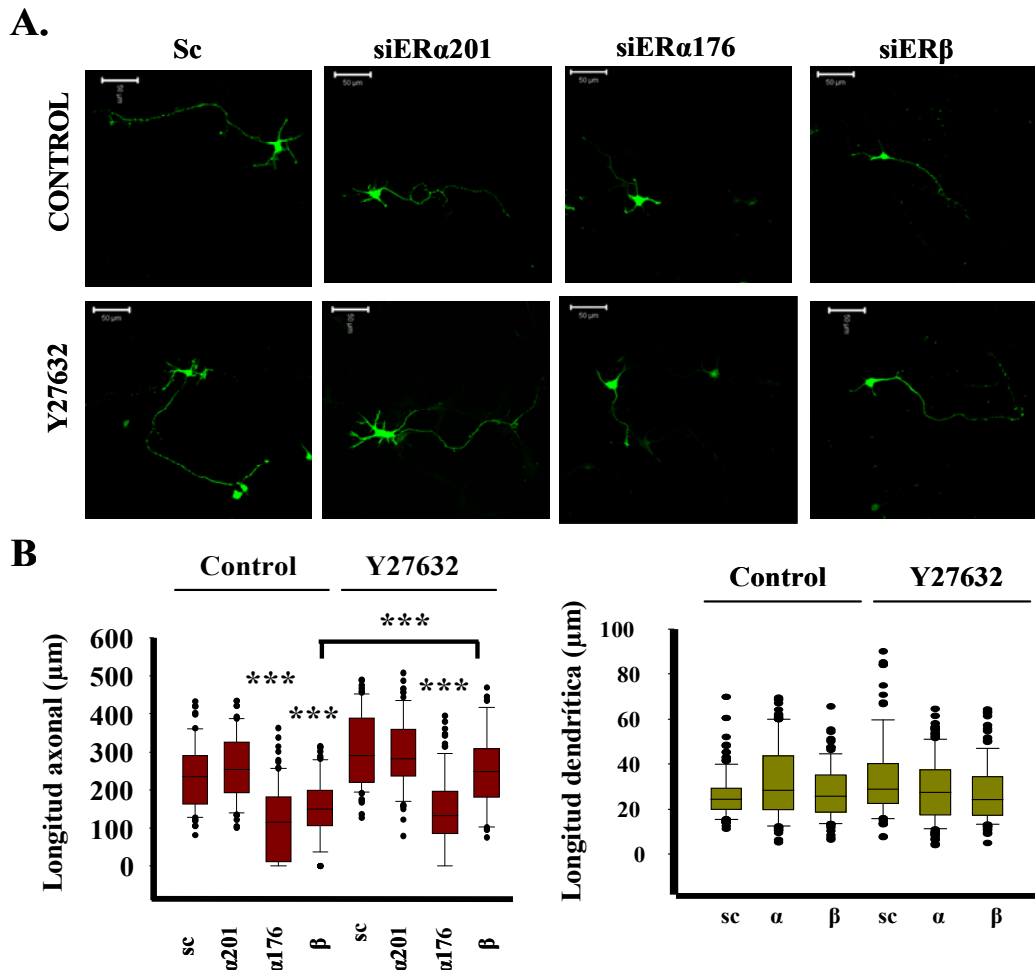


Fig 38. La supresión de la isoforma ER β genera una disminución en la longitud axonal reversible por la adición de Inhibidor de RhoK. A) Neuronas de hipocampo de 3DIV electroporadas con las construcciones de ARN de interferencia para ER α o ER β que fueron tratadas independientemente con el compuesto Y27632 (1 μ M). Observamos similitud de la morfología en neuronas que aunque no expresaban ER β fueron tratadas con el inhibidor de RhoK. **B)** Las neuronas fijadas fueron analizadas para contabilizar las longitudes de axones (gráfica izquierda) y dendritas (gráfica derecha). Sólo se ven modificadas a 3DIV las longitudes axonales con el uso de ARN de interferencia de ER β o el interferente de α 176. Los datos mostrados proceden de n=3 experimentos independientes en los que se contabilizaron 100 neuronas/experimento. ***p \leq 0,001. La longitud axonal en neuronas ARNi-ER β se ve incrementada con el tratamiento de Inhibidor de RhoK ***p \leq 0,001.

Con estos datos, analizamos la posible recuperación de la longitud axonal en neuronas electroporadas con la construcción interferente específica de ER β . Se contabilizaron las longitudes de las dendritas con los interferentes y su combinación con el tratamiento con el inhibidor de RhoK (Fig. 38 B).

Como se observa en la gráfica de la figura 38, los resultados de las cuantificaciones de la longitud de las dendritas en estos 3 DIV no presenta diferencias estadísticas entre los diferentes grupos (ni con interferentes de ER α ni con interferentes de ER β) y su variación es mínima también con el tratamiento de Y27632 [Longitud dendrítica media: **sc**: $24,87 \pm 0,79$ μm , **siER α** : $28,77 \pm 1,51$ μm , **siER β** : $25,97 \pm 1,1$ μm , **sc+Y27632**: $29,21 \pm 17,82$ μm , **siER α +Y27632**: $28,52 \pm 1,2$ μm , **siER β +Y27632**: $24,38 \pm 1,28$ μm].

Sin embargo, observamos una recuperación total de la longitud axonal cuando las neuronas con niveles reducidos de ER β son tratadas con Y27632 hasta alcanzar una longitud similar a la de la situación control, ver la figura 38 B [Longitud media axonal: **sc**: $248,58 \pm 11,19$ μm y **siER α** : $261,28 \pm 10,53$ μm frente a **siER β** : $151,14 \pm 9,63$ μm y **sc+Y27632**: $294,07 \pm 11,88$ μm frente a **siER β +Y27632**: $253,10 \pm 13,63$ μm].

Como resumen de los datos obtenidos acerca de la capacidad de modificación de la elongación axonal con el compuesto Y27632, nuestros datos sugieren la modulación de proteínas implicadas en la dinámica del citoesqueleto de actina en el bloqueo generado por ICI. Las neuronas tratadas con Y27632 en las que se reducen los niveles de ER α (construcción “176”) no consiguen adquirir una elongación comparable a las neuronas electroporadas con el plásmido vacío o con el plásmido vacío junto con el tratamiento de Y27632.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN.

El propósito de este trabajo ha consistido en dos puntos principalmente. Por un lado analizar qué papel desempeñan los receptores de estrógenos en la morfología neuronal durante el desarrollo *in vitro* de neuronas primarias. Por otro, nos propusimos profundizar en los mecanismos moleculares que se desencadenan con la activación de receptores de estrógenos mediante la interacción con la ruta PI3K-Akt.

Efecto morfológico mediado por estradiol.

Nuestros datos indican que la adición de estradiol en las neuronas de hipocampo en desarrollo *in vitro* promueve la extensión de las neuritas.

El efecto del tratamiento de estradiol sobre la morfología, que observamos en los cultivos realizados de neuronas primarias, es un incremento leve en la longitud axonal, de aproximadamente 1.49 veces mayor en neuronas tratadas con estradiol respecto a las neuronas control (longitud media control a 3 DIV en control: $247,57 \pm 12 \mu\text{m}$ frente a tratadas con estradiol: $370,27 \pm 20 \mu\text{m}$). Aun obteniendo este incremento con la adición de estradiol creemos importante resaltar que posiblemente este dato está enmascarado en parte por un lado por la presencia de estrógenos que en situación basal se encuentran en los suplementos utilizados en el cultivo y que son necesarios a la hora de mantener los cultivos hasta 7 DIV para nuestros análisis. Otro aspecto determinante puede ser el hecho de que las neuronas primarias ya estén pre-condicionadas por un alto número de factores tróficos y hormonas que no podemos determinar con certeza.

Como alternativa a este análisis nos propusimos hacer lo contrario, es decir interferir o bloquear los receptores de estrógenos para inferir en su funcionalidad. Para tener una visión más clara acerca de la implicación de los receptores de estrógenos nos propusimos analizar en ese punto cual o cuáles de los receptores de estrógenos, de entre los tres descritos en la actualidad ER α , ER β o GPR-30, estaba implicado en este proceso. Entre las isoformas α/β y el receptor GPR30 no existe homología de secuencia y presentan diferentes afinidades a compuestos estrogénicos y anti-estrogénicos. Por ejemplo, el compuesto “antiestrogénico” ICI que actúa como antagonista sobre los receptores ER α y ER β , y parece ejercer de agonista cuando interacciona con GPR30 (Filardo and Thomas 2005; Prossnitz et al. 2008).

Nuestros datos revelan que la adición del compuesto ICI en el cultivo de neuronas de hipocampo reduce la morfología tanto en condiciones control como en combinación con el estradiol. La reducción en la longitud axonal y de dendritas se observa desde los 3 primeros días del cultivo haciéndose más notable a los 7 días. En el caso de la longitud axonal los datos obtenidos son los siguientes: Control: $349,14 \pm 20 \mu\text{m}$ *versus* ICI: $98,52 \pm 11 \mu\text{m}$, resultando en una longitud 3,5 veces menor en las neuronas tratadas. Para la longitud dendrítica se obtuvieron las siguientes longitudes medias: Control: $60,35 \pm$

5,19 μm frente a ICI: $20,59 \pm 1,47 \mu\text{m}$, lo que significa una disminución en torno a 2,9 veces con el tratamiento respecto al control.

El hecho de que el efecto de estradiol en morfología se elimine con la adición de ICI parece sugerir fuertemente que las principales isoformas implicadas en la función morfológica de las neuronas son las formas clásicas ER α /ER β para las cuales este antagonista presenta una afinidad similar (Leblanc et al. 2007) y cuya expresión habíamos podido determinar en los cultivos neuronales. Para confirmar esta idea, nuestro siguiente paso en este punto fue analizar si existen diferencias funcionales en el efecto morfológico entre las dos isoformas ER α y ER β , para lo cual primero estudiamos su expresión.

Cuando visualizamos la expresión de ER β en neuronas mediante *western blot* observamos una única banda identificable con los anticuerpos específicos de esta isoforma. Sin embargo, a la hora de examinar la expresión de ER α , detectamos la presencia de múltiples bandas, utilizando anticuerpos específicos que reconocen varias regiones de esta isoforma procedentes de varias casas comerciales. En principio todas ellas podrían ser atribuidas a posibles formas de ER α por lo que nos propusimos analizar más en detalle las bandas de proteína obtenidas para los ERs mediante la utilización de ARN de interferencia. Para la disminución de la expresión de las isoformas de ER α y ER β se probaron diferentes construcciones de ARN interferente. En el caso de ER β se seleccionaron dos de ellos que reducen por igual y eficientemente la única banda observada en *western blot* a partir de extractos de neuronas primarias.

La utilización de los interferentes de ER α nos permitió elucidar cuáles son las bandas de proteína observadas mediante *western blot* que finalmente concretamos como ER α genuínas. De entre las cinco construcciones de las que disponíamos seleccionamos tres de ellas por su eficiencia en la supresión de la expresión de la banda de 66KDa correspondiente al tamaño molecular esperado para la proteína ER α . Estas construcciones son las siguientes: “176” (que reconoce una secuencia en el exón1), “184” (secuencia complementaria al exón 5) y “201” (secuencia complementaria al exón 8). A pesar de eliminar la expresión de la banda de ER α correspondiente a 66KDa, y dos minoritarias de un tamaño menor (en torno a los 60KDa), ninguno de ellos suprime la expresión de la detección en *western blot* de la señal situada en torno a los 45KDa.

Nos decidimos entonces a comparar el patrón de bandas obtenido con varios de los anticuerpos de ER α en las neuronas y en la línea celular MDA-MB-231 descrita como ER negativa (Cailleau et al. 1974; Weigel and deConinck 1993). En MDA-MB-231 aunque no se encuentra las bandas correspondientes a ER α (66KDa) sí se detecta señal en torno a los 45KDa.

Concluimos que, dado que ningún interferente modifica la expresión de la banda detectada en 45 KDa y que ésta se encuentra presente en una línea celular negativa para ER α , que las bandas correspondientes a esta isoforma son las tres bandas que aparecen en torno a 66KDa. Creemos obligado por su identidad como formas de ER α la caracterización de dichas modificaciones en futuros trabajos.

Seleccionados los ARN de interferencia que suprimen ER α (los correspondientes a las construcciones denominadas “176”, “201”) y ER β (correspondientes a las denominadas “215”, “150”) especificadas en la **Tabla 3** de *Materiales y Métodos*, analizamos qué efecto tienen sobre la adquisición de la morfología neuronal.

La morfología obtenida con la disminución de los niveles de ER β por sí sola es similar a la adición del antagonista de los receptores de estrógenos con una clara reducción de la longitud del axón y de las dendritas. Los datos que obtenemos, idénticos independientemente de la construcción utilizada, son de una disminución de aproximadamente 1.3 veces de la longitud axonal con la interferencia de ER β a 3 DIV y 3.9 veces menor que el control a 7DIV.

En comparación, la disminución de los niveles de ER α a 3 DIV utilizando el interferente “201” aún desapareciendo eficientemente la forma de 66KDa, genera una reducción en la longitud axonal mucho más leve que se hace visible a los 7 días del cultivo. Es importante destacar que el uso de otro de los interferentes específicos de ER α , el correspondiente al número “176” resulta generar un fenotipo de reducción axonal claro detectable a los 3 DIV. Las diferencias morfológicas observadas con la introducción de diferentes construcciones que suprimen eficientemente la expresión de ER α de 66KDa podrían deberse a diferencias en la supresión de las variantes de ER α de menor tamaño, próximas a 66KDa y pensamos que es un punto interesante para estudiar en profundidad. Los datos obtenidos parecen indicar que la reducción de la expresión de ER α (66KDa) disminuye de manera significativa la longitud axonal a los 7 DIV y de una manera más clara sobre la longitud dendrítica, aunque en menor grado que el obtenido con la reducción de la expresión de ER β .

La generación de ratones deficientes en la expresión de ER α o ER β generados en diferentes laboratorios pone de manifiesto la posibilidad de conseguir un desarrollo del Sistema Nervioso Central funcional en ausencia de cada isoforma de los ERs. En dichos ratones se han identificado algunas modificaciones leves en la conformación de las sinapsis o en la organización de las capas neuronales de la corteza. Podríamos pensar que la implicación de los receptores de estrógenos que nosotros detectamos en el cultivo de neuronas “*in vitro*” resulta mermada *in vivo* por la complejidad y el número de factores neurotróficos que se encuentran presentes en el animal además del soporte glial de gran importancia para el mantenimiento neuronal. Precisamente por la interacción descrita entre la vía activada por la insulina/IGF-1, entre otras, y la vía de ERs podría darse un ajuste en los ratones deficientes para ERs que fortalezca la señalización que media la estimulación de esas rutas alternativas utilizando el resto de formas de ER presentes. Además existe la posibilidad de que parte de la función de una de las isoformas pueda ser suplida por la presencia de la otra *in vivo* o por la función de GPR-30. En cualquier caso, sería de gran interés el estudio del proceso de diferenciación neuronal en cultivo partiendo de la corteza o el hipocampo embrionario de estos ratones deficientes para ER α , ER β o GPR-30 ya que no existen dichos estudios por el momento.

Podemos concluir de estos resultados que la disponibilidad de los receptores de estrógenos ER α y ER β es esencial para al menos las primeras etapas del desarrollo de las neuronas en cultivo. Los datos

referentes a la suficiencia de la supresión de ER α o de ER β para obtener una reducción de las longitudes de neuritas (dendritas y axón), restaría protagonismo inicialmente a la posibilidad de actuación de GPR30 en esta función de estradiol.

Un elemento importante para la maduración del compartimento axonal es la formación del segmento inicial del axón (Garrido et al. 2003). Dado que la adición de ICI genera axones “atrofiados” morfológicamente quisimos comprobar la presencia/ausencia de la formación de este compartimento neuronal, que puede detectarse por el enriquecimiento en varias proteínas entre ellas P-Ikba {Schultz, 2006 #137; Palay et al. 1968; Sanchez-Ponce et al. 2008). Nuestros datos indican que la aparición del segmento inicial del axón no parece estar modificada por el bloqueo de los receptores de estrógenos α y β , ni en el momento de aparición del mismo ni en el número de neuronas que lo desarrollan.

El bloqueo de ERs parece estar impidiendo de una manera clara la elongación de todos los procesos neuríticos y no el bloqueo de maduración de compartimentos. Es de especial interés analizar si la función de ERs en el crecimiento de axones y dendritas está restringido a estadios iniciales del desarrollo o por el contrario se trata de una función mantenida también en las estructuras ya maduras.

La expresión de ER α y ER β desde un estadio temprano en el desarrollo embrionario, que coincide con el inicio de la formación del tubo neural (Zhang et al. 2008), y su presencia en adulto en donde ambas proteínas se encuentran en numerosas áreas cerebrales y en el Sistema Nervioso Periférico, sugiere funciones de ERs en el mantenimiento de la actividad de estas regiones. Los datos existentes en relación a la plasticidad neuronal, el incremento en la densidad de espinas dendríticas (Gould et al. 1990; Li et al. 2004; McEwen et al. 1999; Woolley and McEwen 1992) y la implicación de los estrógenos en la excitabilidad, revisado en (Kelly and Ronnekleiv 2009) que tienen lugar en el cerebro adulto indican que la capacidad de remodelación favorecida por estradiol debe ser analizada también en neuronas que pueden estar ya inmersas en circuitos neuronales establecidos.

Los datos recopilados hasta ahora en diferentes laboratorios desde la caracterización de la afinidad de GPR-30 por estradiol, apuntan a un papel de éste en la capacidad de modular la excitabilidad de la membrana y la respuesta de calcio en hipocampo (Noel et al. 2009), de ahí el interés de extender el estudio de los receptores ERs al análisis de la función de GPR-30 en las neuronas maduras. En trabajos recientes realizados en células de origen tumoral se propone una interacción secundaria de la activación de GPR-30 con la de ERs por lo que deberían estudiarse en una posible cooperación en la señalización.

Aunque en este trabajo hemos centrado nuestra atención a la longitud axonal como parámetro indicador del desarrollo neuronal, es clara también la reducción inducida por ICI en la longitud de las dendritas. Las dendritas siguen un mecanismo diferente de iniciación y elongación. Puede bloquearse la formación del axón bloqueando la actividad de varias quinasas, entre ellas JNK o PI3K sin afectar el desarrollo de las dendritas (Oliva et al. 2006; Shi et al. 2003). Su composición proteínica es diferente y también la señalización. Una de las diferencias radica en la disposición de los microtúbulos en el

interior de las dendritas (Baas et al. 1988). Tratándose de compartimentos con una composición diferente y estructuras con propiedades distintas, el análisis del efecto de ERs sobre las dendritas requeriría un estudio completo, interesante además sobre neuronas maduras dada la implicación de ER en la formación de densidades post-sinápticas y espinas dendríticas.

Implicación de la dinámica de actina en el efecto morfológico mediado por ERs.

Uno de las consecuencias de la adición de ICI a las neuronas en cultivo es la formación de zonas densas de actina polimerizada en los extremos en crecimiento. Podríamos pensar que la falta de dinamicidad de actina en las zonas en crecimiento puede impedir la protrusión del citoesqueleto de tubulina en los conos de crecimiento (Bradke and Dotti 1999).

La elongación del axón viene determinada entre otras cosas por la disponibilidad de actina con capacidad de polimerizar para estabilizar el crecimiento y despolimerizar para favorecer la extensión del cono de crecimiento. Un grupo de elementos esenciales que controlan esta dinámica son las proteínas Rho-GTPasas (Kunda et al. 2001; Luo 2000).

Existen datos recientes que indican una posible regulación de ER α de algunos de modularores de la dinámica de actina en varios tipos celulares tumorales a través de la interacción de ERs con Src (Migliaccio et al. 1996) y la estabilización de la proteína p190, una proteína GAP común a varios miembros de la familia Rho-GTPasas. Por otra parte, otros datos sitúan a ER α próximo a la membrana plasmática de las neuronas de hipocampo, que como se ha descrito en neuronas puede deberse en parte por su interacción con p85 (Cardona-Gomez et al. 2002a; Cardona-Gomez et al. 2002b; Mendez et al. 2003) a través de la cual se incrementa actividad de PI3K. La proporción de Rac, cdc 42 y Rho activo determina la dinámica final de la formación de filamentos de actina. Una de las principales proteínas diana de la GTPasa Rho es RhoK. Es suficiente en algunos sistemas la activación de RhoA o RhoK para inducir el colapso del cono de crecimiento de las neuronas. Aunque son numerosas las proteínas que determinan la formación de estructuras de actina polimerizada, el bloqueo de RhoK para obtener una mayor elongación axonal en neuronas de hipocampo como se ha descrito en otros trabajos (Da Silva et al. 2003).

En este trabajo, hemos visto cómo la inhibición de RhoK también promueve la extensión del axón en neuronas tratadas con ICI.

Sin embargo, la respuesta al inhibidor de RhoK es diferencial para ER α y ER β . En neuronas en las que se ha reducido la expresión de ER β , el inhibidor de RhoK es totalmente efectivo para continuar la elongación axonal. Se obtienen en estas condiciones longitudes axonales que no presentan diferencia significativa respecto al control sin tratar. En concreto la longitud media axonal obtenida con la inhibición de RhoK en neuronas en las que se suprime la expresión de ER β es de aproximadamente 250 μ m frente a la obtenida con la supresión de ER β sin tratamiento, 150 μ m. Estos datos muestran una clara reversión de la reducción axonal con la inhibición de RhoK. Un posible mecanismo de acción tras la activación de ER β podría ser el desbalance de la actividad de Rho, lo que significaría

que la reducción de ER β podría resultar en una activación parcial de RhoK que podría dar cuenta de la menor elongación de las neuritas, aunque es una hipótesis aún por determinar. Sería interesante en este punto analizar la posible activación de RhoA en comparación con Rac y Cdc42 mediado por ER β .

Este efecto de reversión de la morfología que se obtiene con el Inhibidor de RhoK sobre reducción de los niveles de ER β , no se observa en el caso de la supresión de la isoforma α con la construcción de ARN interferente “176” con la que se obtiene una disminución apreciable en longitud axonal. Estos datos sugieren una señalización diferencial mediada por cada isoforma de estrógenos al menos en cuanto a la posible regulación de la actividad de las Rho-GTPasas.

Por otro lado, como alternativa para modificar la dinámica del citoesqueleto de actina, tratamos las neuronas con citocalasina D con la que se consigue una despolimerización total de la actina. El fenotipo obtenido con la adición de ICI es similar al que se obtiene con la combinación de ICI junto con citocalasina D.

Por un lado el tratamiento sencillo con ICI da lugar a una longitud media axonal de 100 μm y la combinación de este compuesto con la droga citocalasina D da lugar a una longitud media de 93 μm . Estos datos sugieren como parte del efecto mediado por ICI la desregulación de la dinámica de actina.

Localización celular de ER α y ER β en las neuronas primarias.

Según se viene describiendo en los últimos años, los receptores de estrógenos se encuentran presentes en diferentes emplazamientos en la morfología neuronal. Se han descrito además de en citoplasma y núcleo, en espinas dendríticas donde parecen estar regulando la síntesis local de proteínas como PSD95 (Akama and McEwen 2003), necesaria para la estabilización de los contactos sinápticos. Además de estas localizaciones se han descrito en mitocondrias en neuronas de hipocampo (Yang et al. 2004) y en asociados a la membrana plasmática (Razandi et al. 2003), además de la localización en la membrana de GPR-30.

En este trabajo se expone la detección de ER α y ER β a lo largo de axones y dendritas en neuronas de corteza e hipocampo en estadios tempranos de su desarrollo *in vitro*. Su localización se extiende hasta los extremos en crecimiento, destacando especialmente en el cono de crecimiento axonal. Con esta, aparentemente, distribución axonal, quisimos comprobar si existía algún tipo de interacción de ER α con el citoesqueleto de tubulina. Es necesario tener en cuenta que los datos obtenidos acerca de la localización de ER α mediante inmunocitoquímica requieren de otros estudios, dada la detección con varios anticuerpos diferentes de una banda de identidad desconocida situada en 45KDa en inmunotransferencia. Como refuerzo para la comprobación de la localización de ER α en asociación con el citoesqueleto, se abordó esta posible interacción indirecta mediante el aislado de tubulina polimerizada *in vitro*, ensayo con el cual obtenemos la presencia de ER α (60-66KDa) en la fracción de tubulina polimerizada con dos anticuerpos diferentes dirigidos contra ER α . Uno de ellos, además no detecta en dicha fracción la banda de 45KDa sino únicamente las correspondientes a ER α . Aunque la utilización de los anticuerpos disponibles no nos ha permitido una determinación definitiva, los datos

parecen indicar una asociación de ER α con polímeros de tubulina. La presencia de ER α en esta fracción no implica su asociación directa a los microtúbulos, pero ésta podría ocurrir a través de la interacción de ER α con alguna de las proteínas de asociación a éstos, tanto estructurales (MAPs) como quinesinas. Se ha descrito por ejemplo en varias líneas tumorales de mama la asociación de ER α con la proteína p130Cas, componente del citoesqueleto (Cabodi et al. 2004) o la asociación de ER α con la proteína denominada HPIP (hematopoietic PBX-interacting protein) (Manavathi et al. 2006) que es una proteína asociada a los microtúbulos. Aunque la expresión y localización de estas proteínas no ha sido descrita en el cerebro hasta el momento abren la posibilidad de la existencia de una asociación similar en neuronas.

La localización de ERs en el cono de crecimiento sugiere la posibilidad de que en la función de los receptores de estrógenos en la morfología interviene no sólo la expresión génica mediada por estradiol sino también la activación de otras rutas intracelulares moduladas por la presencia de estrógenos.

Efecto de estradiol en señalización.

El siguiente punto que nos propusimos al realizar este trabajo fue analizar las vías de señalización que se activan con la adición de estradiol a través de ER α y ER β .

Una de las vías de señalización implicadas en el desarrollo neuronal y ampliamente estudiada es la vía de activación de PI3K-Akt-GSK3. La actividad de PI3K es fundamental para la formación y extensión del axón (Jiang et al. 2005; Menager et al. 2004). Datos previos describían la interacción de la ruta de activación de Ins/IGF-1-PI3K con la señalización con estrógenos en cerebro y en neuronas de hipocampo. Dado que ya se había demostrado previamente que estradiol activa Akt en el cerebro (Cardona-Gomez et al. 2002b) comprobamos dicha activación en neuronas de hipocampo.

Para analizar si estradiol induce la actividad de Akt analizamos el estado de fosforilación de sus dos residuos reguladores: Ser⁴⁷³ y Thr³⁰⁸. Nuestros datos muestran un incremento en la fosforilación de ambos residuos en las neuronas tratadas con estradiol respecto a las neuronas control. De ellos, solamente reducimos con la presencia del antagonista de ERs la fosforilación sobre el residuo de Thr³⁰⁸ de Akt.

Dado que la adición de ICI junto con estradiol no reduce la detección de P-Ser⁴⁷³ sería interesante en un futuro analizar la posible implicación del receptor GPR-30 en esta señalización así como la posible activación como respuesta a estradiol de varios de los candidatos para la fosforilación en el residuo de Ser⁴⁷³. El principal efector de la fosforilación del residuo de Ser⁴⁷³ es el complejo mTORC2, aunque hay otras quinasas descritas con esta capacidad como ILK (Delcommenne et al. 1998), MAPK o PKC α .

Detectamos en los tratamientos a tiempos cortos realizados con estradiol en células N2a un breve incremento de la fosforilación de ERK1/2 que es máximo a los 20 minutos habiéndose de nuevo reducido hasta el nivel control en torno a los 30-60 minutos. Observamos que la adición de ICI no bloquea esta activación, este dato estaría apoyado por trabajos previos realizados en células de

neuroblastoma y en explantes neocorticales (Singh et al. 1999; Watters et al. 1997). Por otra parte, existen datos que indican que en algunos sistemas la activación de la vía de MAPK por estradiol tiene lugar a través del receptor GPR30 (Filardo and Thomas 2005), lo que podría resultar ser una explicación para el efecto agonista observado con ICI sobre esta vía que parece tener además una cinética diferente en comparación con el estradiol. Es interesante proseguir el análisis de la señalización estrogénica mediada por, posiblemente, GPR-30 sobre la vía de MAPK que puede repercutir también en la activación de Akt.

Nosotros fijamos nuestros estudios posteriores en los efectos de ERs que son suprimidos con el antagonista ICI 182,780, centrándonos así en la activación de Akt mediada por estradiol que se ve reducida con el antagonista de ERs.

Tomando como punto de partida la activación de Akt con el estradiol en neuronas de hipocampo comprobamos qué ocurre con dos de sus principales dianas: mTORC1 y GSK3. Hemos detallado la repercusión de estradiol sobre una de las dianas de GSK3 en neuronas de corteza y N2a, β -catenina en su función nuclear.

Inhibición de GSK3 por estradiol.

La actividad de GSK3 recae sobre muchas proteínas con funciones muy diversas en la célula entre ellas efectos en la motilidad (Sayas et al. 1999; Sperber et al. 1995) o en supervivencia celular asociada a su inhibición (Cross et al. 1995). Una de estas dianas cuya estabilización responde a estradiol es β -catenina. Hemos visto cómo aumentan los niveles de β -catenina (aproximadamente 2.2 veces respecto a las células sin tratar) en las neuronas de corteza en tiempos que se correlacionan con la cinética de inhibición por estrógenos de la enzima GSK3, que es máxima entre los primeros 30 y 90 minutos de tratamiento. La estabilización de β -catenina tiene lugar por la disminución de la fosforilación en los residuos de GSK3 (Ser³³, Ser³⁷ de β -catenina) detectado con un anticuerpo que reconoce exclusivamente la forma no-fosforilada en dichos residuos.

El efecto de la acumulación de β -catenina tras los tratamientos de estradiol en torno a 20-30 min es extensible a todos los tipos neuronales analizados. β -catenina tiene dos funciones principales: una, mediante su asociación a la membrana plasmática a través del complejo α -catenina- γ -catenina-cadherina estabiliza adhesión celular vía cadherinas, y dos, interacciona con la familia de factores de transcripción TCF/LEF, complejo con el cual activa la expresión de genes diana específicos (He et al. 1998; Hovanes et al. 2001; Jamora et al. 2003; Roose et al. 1999; Shtutman et al. 1999).

Nuestro objetivo fue entonces determinar qué ocurría tras la estabilización de β -catenina inducida por estradiol. Cuando analizamos el contenido en β catenina de las fracciones celulares tratadas con estradiol durante 30 minutos pudimos comprobar que existe un enriquecimiento de β -catenina en las membranas sugiriendo un aumento en la eficiencia de su función en adhesión y/o conformación de estructuras de membrana plasmática. La posible implicación de esta función de β -catenina sobre el efecto global de estradiol-ER en la morfología de la neurona será discutida más adelante.

A pesar de que en el núcleo no se observó ninguna variación en los niveles de β -catenina, y considerando que el método de fraccionamiento puede resultar poco sensible, comprobamos su función transcripcional con un sistema de detección de dicha actividad consistente en plásmidos reporteros dependientes del complejo TCF-ADN.

Activación de la función nuclear de β -catenina por estradiol.

Nuestros datos indicaron que la adición de estradiol durante 60 minutos en neuronas de corteza, tiempo al que se obtiene una buena estabilización de β -catenina, promueve la actividad transcripcional de β -catenina. Dicha actividad se incrementa en torno a 4 veces respecto al control y es dependiente de la interacción de TCFs con su secuencia específica en el ADN. Con la idea de obtener un dato al que referir este aumento observado con estradiol, las neuronas se trataron con insulina con la que se obtuvo un incremento de 10 veces respecto al control. Consideramos que el incremento que produce estradiol sobre la transcripción mediada por β -catenina podría representar valores significativos en comparación con otros factores de crecimiento.

Este dato se comprobó en dos sistemas de detección de transcripción mediada por el complejo β -catenina/TCF: un plásmido reportero introducido en los cultivos neuronales y neuronas primarias procedentes de una colonia de ratones transgénicos en los que el promotor dirige la expresión de β -galactosidasa.

El estudio se completó en la línea neuronal N2a para profundizar en las proteínas implicadas y en los genes que responden de este modo a la presencia de estradiol.

En este efecto de estradiol sobre la activación transcripcional de β -catenina parecen estar implicadas las dos isoformas de ER, α (agonista PPT) y β (agonista DPN), y puede ser bloqueado con el antagonista ICI. Los tiempos con los que se observa una máxima inducción de la transcripción son correlativos con los tiempos de inducción de la estabilización de β -catenina por inhibición de GSK3. La presencia de ambas isoformas de ER en un complejo con β -catenina y GSK3 podría explicar que ambas puedan favorecer la estabilidad de β -catenina. Sin embargo, los complejos en los que se encuentran ER α y ER β son diferentes en composición. Por ejemplo, sólo se ha descrito la interacción de ER α con la proteína p85, subunidad reguladora de PI3K.

Como se ha descrito en la introducción, la familia TCF necesita por un lado su interacción con β -catenina (co-activador) y por otro su unión al ADN para ejercer su función transcripcional.

Para que la adición de estradiol promueva la inducción de genes dependientes de la formación del complejo TCFs/ADN podría ocurrir 1) una interacción directa de ERs con las TCFs, 2) una potenciación de la formación del complejo β -catenina/TCFs o, 3) una interacción directa de los ERs con la secuencia reconocida por los miembros de la familia TCFs. Para estudiar estas posibilidades, determinamos primero la expresión de los miembros de la familia TCF (TCF-1, TCF-3, TCF-4 y LEF-1) en las neuronas de corteza y en células N2a.

Todos los miembros de la familia TCF se expresan en cerebro aunque con diferencias en su distribución. De ellas, se ha determinado que TCF3 y TCF4 parecen ser dispensables para el desarrollo de las estructuras cerebrales posiblemente debido a una menor expresión observada de las mismas en el embrión de ratón en torno al día 9-10 de gestación (Galceran et al. 2000; Korinek et al. 1998). La proteína TCF4 parece ser la que presenta menor expresión en los estadios del desarrollo que nos interesan y nos centramos en los otros miembros que se expresan en las células analizadas.

Sobre la secuencia específica de interacción de los TCFs analizamos cuál de sus miembros era detectable en las células en estudio. De ellos, sólo LEF1 fue detectado en complejo con el ADN.

Nuestros datos indican que la proteína LEF1 se encuentra en condiciones basales interaccionando con su secuencia específica en el ADN. La localización nuclear de LEF-1 en condición de reposo se detectó también mediante fraccionamiento subcelular, en donde aparece enriquecida en la fracción nuclear en comparación con la fracción citosólica. Se ha descrito que en condiciones basales en las que las proteínas TCF/LEF se encuentran asociadas al ADN se presentan formando un complejo con represores de la transcripción (Brantjes et al. 2002; Brantjes et al. 2001).

La detección de LEF1 como principal componente en el sistema utilizado no descartaría que en el cerebro en diferentes regiones puedan darse otras combinaciones de TCFs en asociación con β -catenina en función de la abundancia relativa de cada miembro de la familia. De los estudios realizados con ratones carentes de LEF1 se ha determinado una función de LEF1 en la diferenciación de neuronas granulares del giro dentado en el hipocampo de ratón (Galceran et al. 2000), resultaría interesante analizar la posible modulación de ese mismo evento a través de la interacción de estradiol con la función del complejo β -catenina-LEF1.

Para estudiar en qué medida es necesaria la interacción β -catenina-LEF1, se sobreexpresó una forma de LEF1 con una delección de la región de interacción con β -catenina. La forma $\Delta 56$ -LEF1 es un dominante negativo de LEF1 para la inducción de la transcripción (Roose et al. 1999).

Obtuvimos que los tratamientos con estradiol realizados en las células que sobreexpresan la forma $\Delta 56$ LEF1 no inducen la transcripción de reporteros dependientes de β -catenina/LEF1.

Por otra parte, aunque en útero se ha detectado una interacción de ER α con LEF1/TCF3 (Ray et al. 2008) en neuronas no hemos sido capaces de observar dicho complejo. Es necesario señalar, las diferencias existentes entre ambos tejidos, tanto en cantidad de expresión de ERs como de TCFs en condiciones basales y de la abundancia de ligandos de origen hormonal. Consideramos que ésta puede ser una explicación para los diferentes mecanismos observados.

Además de no observar interacción entre ERs y LEF1 partiendo de extractos totales celulares, en los ensayos de retardo en gel no detectamos a ER α sobre las secuencias de unión de los TCFs. Todo ello, nos induce a pensar que el aumento de actividad nuclear de β -catenina mediado por estradiol se debe a su acumulación y tiene lugar a través de la vía convencional β -catenina/LEF1/ADN.

Es interesante que varios de los componentes en estudio, como ER α y ER β , β -catenina, p85, Akt o GSK3 presentan una localización nuclear además de citoplasmática. Se desconoce la implicación de

las diferentes localizaciones de estos componentes, pero podrían dar lugar a una señalización nuclear además de la que ocurre a nivel de la membrana plasmática.

La regulación de la función transcripcional de β -catenina a través de la activación de receptores de estrógenos α/β supondría un mecanismo adicional a la regulación descrita recientemente a través del complejo c-Jun/Dvl3/TCF4 en líneas celulares (Gan et al. 2008) o Rac1-JNK2 (Wu et al. 2008).

Presumiblemente, la llegada de estradiol y su interacción con los receptores ERs da lugar a la estabilización de β -catenina (por inhibición de GSK3 dependiente de Akt) en un complejo existente en ausencia de hormona y tras esta estabilización se produce la interacción de β -catenina con la maquinaria de transcripción y los TCFs ya en las secuencias del ADN específicas. Este mecanismo se propone dada la localización inicial de LEF1 en el núcleo y la ausencia de un complejo LEF-ER en neuronas.

Queremos señalar que tanto GSK3 como β -catenina forman parte de otras vías de señalización, como la vía de Wnt y que se determinó la interacción de ER α con β -catenina como con GSK3 en hipocampo (Cardona-Gomez et al. 2004) y también de ER β como se describe en este trabajo. Analizamos entonces la posible interacción de ERs con otro de los componentes de la vía de Wnt como es la proteína APC. Del análisis de la inmunoprecipitación obtuvimos que ni ER α ni ER β interaccionan con la proteína APC en células N2a, si bien parece existir una interacción entre ER β con alguna de las formas de APC en extractos de corteza embrionaria. Se han descrito varias formas de procesamiento del ARNm de APC, alguna como la forma denominada APC2, muy abundante en el cerebro (Yamanaka et al. 2002) y parece tener una función en el desarrollo embrionario por su patrón de expresión, aunque no se ha determinado en detalle su implicación hasta el momento. Las posibles interacciones de ER β con variantes de APC merecerían un análisis más extenso.

En resumen, se puede decir que estradiol está utilizando el complejo β -catenina/LEF1/ADN para parte de su señalización. Con el propósito de conocer si estradiol está utilizando finalmente la vía Wnt o lo hace a través de una nueva alternativa realizamos una comparación de la expresión génica obtenida con la adición de Wnt3a frente a la obtenida con estradiol en neuronas de corteza de 2 DIV y en N2a, en las que se introdujo un dominante negativo de LEF1.

En primer lugar, se eliminaron durante el estudio de los datos obtenidos por los microarrays aquellos genes que eran regulados por estradiol y no eran sensibles a la presencia/ausencia de LEF1 funcional.

Tras este primer punto de corte, el análisis se centró en la comparación de genes inducidos y reprimidos con ambos tratamientos. En el caso de la comparación de estradiol el número de genes incrementados es de 102 y de disminuidos de 121. Con el tratamiento de Wnt3a se vieron incrementados 137 genes y disminuidos 166. La lista de los genes activados con Wnt dependientes de LEF1 y los activados por estradiol dependientes de LEF1 presenta pocas coincidencias sugiriendo una regulación en parte independiente.

En segundo lugar, de los datos obtenidos tras la comparación del bloque A (cDNA3.1) respecto al bloque B (Δ 56LEF1) se eliminaron aquellos genes que no presentaban variación significativa y nos centramos en aquellos cuya variación (expresada en $\log_2 R$) era mayor o menor a 1.

En la **tabla 4** (pág.152) se muestra una selección de la comparación de genes en la que aparecen tanto algunos genes incrementados como reducidos con el análisis del bloque A frente al bloque B con el tratamiento de estradiol (para una información detallada ver CD anexo).

Para validar estos datos obtenidos a partir del ARN, comparamos la expresión de aquellas proteínas cuyos niveles de ARNm han sido modificados tras los tratamientos en células-control y células- Δ 56LEF1/N2a obtenemos una serie de proteínas con diferentes patrones.

No varían, en la comparación de células cDNA3 o Δ 56LEF1, algunos de los componentes de la ruta de señalización en estudio como GSK3 β o β -catenina ni en los niveles de ARN ni en proteína.

Con el análisis de las células que sobreexpresan Δ 56LEF1 destaca el incremento en los niveles de E-cadherina, efecto observado en trabajos previos realizados en células tumorales. Como se ha descrito en otros trabajos realizados en líneas tumorales, la proteína LEF1 ejerce una regulación negativa sobre el promotor de E-cadherina y esta desregulación da lugar a la potenciación de la transición epitelio-mesénquima en líneas de origen tumoral, revisado en (Peinado et al. 2007).

Por ejemplo, de los genes analizados también a nivel de proteína, la proteína ciclina D2 deja de responder a la presencia de estradiol en las células Δ 56LEF1/N2a, lo mismo ocurre con la proteína N-cadherina. Éstas son buenas candidatas para un análisis posterior de sus regiones de promotores y los mecanismos por los cuales estradiol activa su expresión de una manera dependiente de LEF1 al menos en las células N2a. Consideramos de especial interés en este punto la identificación de algunos genes que sigan este comportamiento en las neuronas primarias ya que pueden ofrecer un conjunto de genes diferentes.

Todos estos datos parecen indicar que los receptores de estrógenos inducen la transcripción mediada por β -catenina sobre promotores que contienen secuencias de interacción de LEF1. La escasa coincidencia de los genes inducidos por estradiol dependientes de LEF1 y los activados por Wnt hace pensar que la especificidad del inicio de la señalización es elevada, parte de la cual puede estar respondiendo a la diferente composición de la maquinaria de transcripción en torno a β -catenina/LEF1. Es interesante pensar en la especificidad de expresión génica conseguida en función de la composición del medio extracelular en hormonas estrogénicas, insulina y otros factores de crecimiento, muy abundantes en el cerebro.

La comparación de los datos, independientemente de que en diferentes tipos neuronales pudiesen obtenerse listados diferentes, indica dos puntos muy importantes. Primero, que hay un grupo de genes regulados por estradiol que son idénticos a los regulados por Wnt. Esto podría indicar que parte de la señalización a partir de β -catenina y LEF-1 es finalmente idéntica a la que se desarrollaría desde Wnt. Alternativamente, estradiol podría estar activando a cierto nivel la secreción de Wnts.

En cualquier caso, hay un segundo grupo de genes regulados por estradiol y sensibles a LEF1 que hace pensar que la especificidad del inicio de la señalización es elevada, parte de la cual puede estar respondiendo a la diferente composición de la maquinaria de transcripción en torno a β -catenina/LEF1, de como lo haría sólo Wnt.

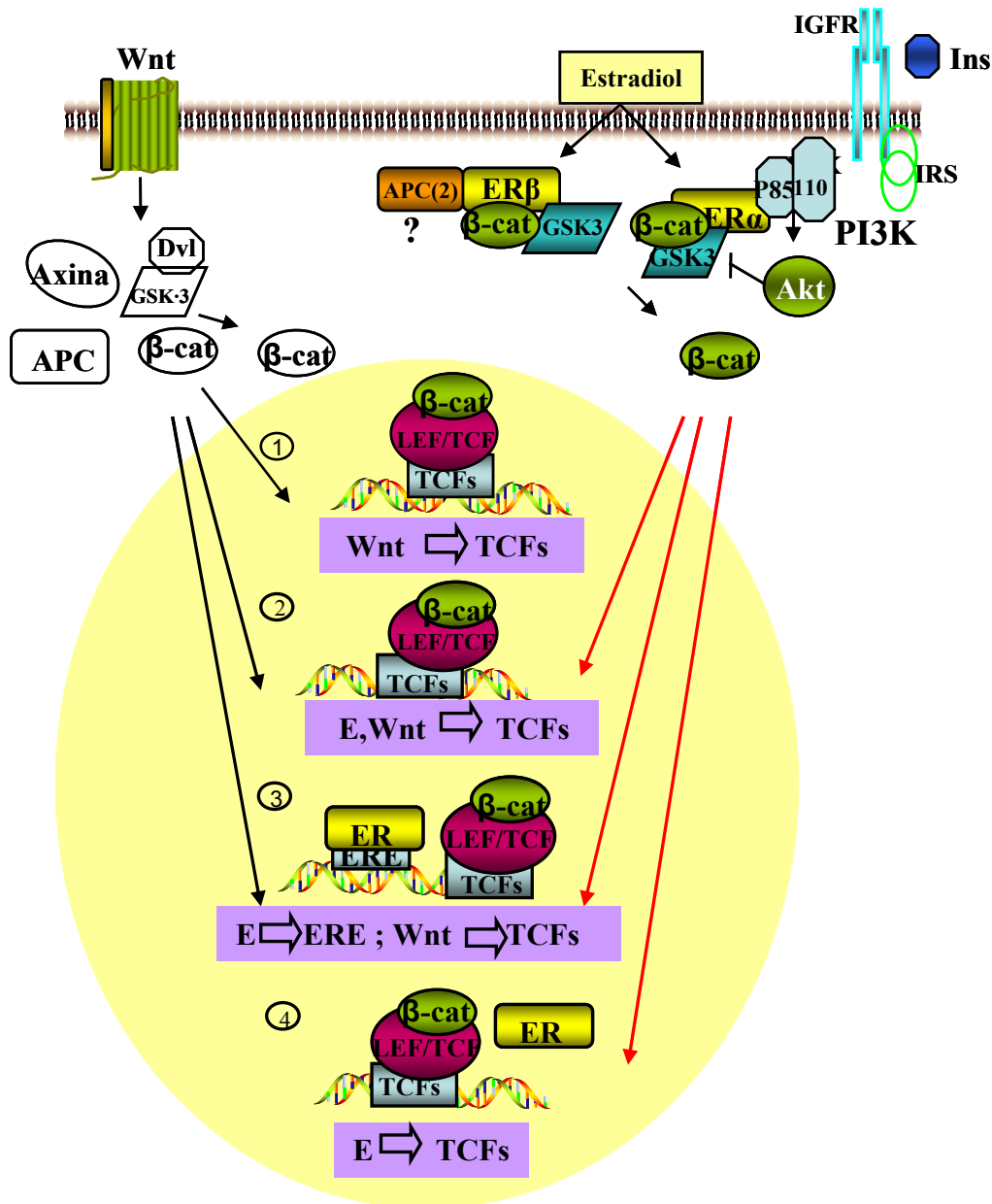
Además aunando estos resultados con otros trabajos presentes en la bibliografía, clasificaríamos en cuatro tipos de promotores, como se muestra en el **esquema 10**, que responden a β -catenina: 1) por asociación directa de β -catenina/TCFs dependientes de Wnt, 2) por asociación de β -catenina/TCFs modulados tanto por estradiol como por Wnt en la misma región del promotor o 3) en distintas regiones del mismo promotor y 4) por asociación de β -catenina/TCFs regulado por estradiol pero no Wnt.

La interacción de dos reguladores de la expresión génica (ER y β -catenina) en neuronas y en otros tipos celulares sugiere la posibilidad de una mutua influencia sobre cada uno de sus complejos de transactivación. Por el momento, se ha determinado la implicación de β -catenina en la capacidad de expresión génica mediada por ER sobre un promotor artificial en líneas de cultivo tumorales (MCF-7 y SW480), la integración de la señalización de Wnt y estrógenos a través de la proteína EZ2H en células tumorales (Shi et al. 2007) y en un abordaje *in vivo* en *Drosophila* (Kouzmenko et al. 2004).

Las funciones descritas de los receptores de estrógenos sobre la transcripción mediada por β -catenina pueden jugar un efecto determinante, en combinación con el gradiente de proteínas Wnt, en la proliferación de precursores neuronales o en la determinación del linaje neuronal. Se ha descrito también una mayor neurogénesis en función de la concentración de estrógenos en el giro dentado del hipocampo en cerebro adulto de ratón y rata, dicha diferenciación neuronal podría estar determinada también en combinación con las proteínas Wnt.

Por último, cabe mencionar que las formas delecionadas de los miembros de la familia TCF se encuentran presentes de manera endógena en varios tejidos cancerosos como formas alternativas de *splicing* (Hovanes et al. 2001) y en las células N2a analizadas. Su proporción respecto a las formas completas es baja. Se desconocen los mecanismos por los que las células expresan estas formas “dominantes negativos” de TCFs pero parecen jugar un papel importante en la progresión de algunos tumores. Hay que tener en cuenta también las diferencias en abundancia relativa de cada miembro de la familia de TCFs en diferentes regiones del cerebro lo que podría dar lugar al mismo mecanismo descrito para LEF1 con otro de los componentes de la familia TCF como protagonista.

Por los datos obtenidos, en cuanto a su regulación por estradiol, la existencia de las formas truncadas de TCFs de manera natural en las células podría determinar la respuesta a estradiol de algunos tumores y estaría por determinar si estas formas se dan en neuronas primarias.



Esquema 10. Esquema de la hipótesis del mecanismo de acción de ERs sobre la activación transcripcional de β-catenina. A través de la inhibición de GSK3 por estradiol se consigue la estabilización de β-catenina y la activación de la transcripción génica mediada por su interacción con miembros de la familia TCF/LEF. Se muestran las cuatro posibilidades propuestas en cuanto a la formación de complejos sobre el ADN que se podrían dar como respuesta a la estabilización de β-catenina en función de la presencia de estradiol o Wnt. 1) respuesta sobre promotores con secuencia específica para TCFs de respuesta exclusiva a la activación de vía Wnt; 2) respuesta común a estradiol y Wnt sobre promotores con secuencia específica TCF; 3) regulación de un mismo gen a través de dos promotores diferentes, uno con secuencia ERE, otro con secuencias para TCFs o 4) regulación sobre promotores con sitios TCF exclusivos de respuesta a estradiol y no Wnt. Se plantea la posibilidad de la regulación del complejo citosólico de β-catenin/axina/APC/GSK3 a través de estradiol lo que implicaría una especificidad de los complejos nucleares en función del ligando (Wnt o estradiol).

Activación de Rheb/mTORC1 por estradiol.

Siguiendo con el análisis del efecto de estradiol sobre las dianas de Akt, hemos observado una activación de la ruta mTORC1 tras la adición de estradiol en neuronas de hipocampo.

La actividad de Akt activa esta vía por fosforilación de las proteínas TSC1/TSC2 que son inhibitorias para Rheb, un intercambiador de GDP por GTP cuya acción es fundamental para la activación de mTORC1. Esta vía, que está implicada en múltiples funciones celulares como respuesta a nutrientes, aumento en la eficiencia de traducción de proteínas, tamaño celular entre otros, últimamente se le ha implicado en varios trabajos con la capacidad de extensión axonal (Choi et al. 2002; Morita and Sobue 2009; Park et al. 2008) en neuronas de diferente origen. Esta vía cobra especial relevancia en aspectos clínicos, puesto que mutaciones en TSC1/TSC2 dan lugar a una enfermedad multiorgánica denominada *tuberous sclerosis* que se caracteriza por la aparición de hamartomas en diversos órganos y en otros aspectos por un menor tamaño cerebral y retraso mental (Inoki et al. 2005a). Otros datos indican la implicación de la regulación de TSC1/TSC2 en el desarrollo a raíz de la observación de que mutaciones en estas proteínas dan lugar a una muerte embrionaria (Inoki et al. 2005b).

La utilización de rapamicina desde el primer día de su plaqueo hasta el día 3 sobre las neuronas de hipocampo impide la elongación normal del axón, sin afectar la longitud de las neuritas. Nuestros datos muestran una reducción en la longitud axonal con la adición de rapamicina 20 nM de aproximadamente 1,85 veces respecto a las neuronas control. Otros datos en la bibliografía muestran una inhibición completa de la aparición del axón en neuronas utilizando altas concentraciones de rapamicina desde 50nM hasta 500 nM (Li et al. 2008).

Tratamientos con estradiol durante los primeros días del desarrollo *in vitro* de neuronas de hipocampo dan lugar a un aumento en la fosforilación de S6 que reporta la actividad de S6K. Comprobamos que esta fosforilación responde fundamentalmente a la actividad del complejo mTORC1 con el bloqueo total obtenido con la adición de rapamicina.

El aumento de la actividad de mTORC1 por estradiol es dependiente de los receptores ER α/β puesto que el efecto es bloqueado en presencia del antagonista de ERs, ICI 182,780, lo cual podría permitir restar importancia en esta vía al otro receptor de estrógenos, GPR-30, dada su diferente respuesta a este antagonista.

¿La neuritogénesis mediada por ER está controlada por la señalización citoplasmática?

Como hemos indicado en el primer capítulo, los receptores de estrógenos α y β modifican con su actividad la morfología neuronal.

Esta neuritogénesis podría estar mediada por vías genómicas dirigidas directamente por ERs y/o no-genómicas que tienen lugar por la interacción de ERs con otras vías de señalización, como por ejemplo con la vía PI3K-Akt.

Es conocido que de la activación génica mediada por la interacción directa de ER a complejos de transcripción se obtiene la expresión de numerosos genes de proteínas con funciones en supervivencia (Garcia-Segura et al. 1998; Patrone et al. 1999; Sohrabji et al. 1995) y proliferación en células de origen no-neuronal. Aunque parte de las proteínas inducidas por estradiol puedan ser algunas de las

proteínas de asociación al citoesqueleto o desempeñar un papel en adhesión existen datos suficientes para plantear gran parte de los efectos mediados por estradiol-ERs por la señalización denominada como no-genómica.

En relación a la modulación de actina se ha comentado que con la inhibición de RhoK conseguimos revertir la morfología que adquieren las neuronas con la supresión de ER β .

Hemos tratado de comprobar en qué medida la actividad de PI3K-Akt inducida por estradiol modula la morfología neuronal haciendo hincapié en las dianas de Akt o de sus dianas directas que se modulan por estradiol.

Recordemos que la actividad de PI3K juega un papel importante en la adquisición de la morfología neuronal, en concreto en la formación y elongación axonal. El bloqueo de PI3K impide la formación del axón. Hemos visto que la adición de estradiol no es capaz de “corregir” la inhibición de PI3K. Como se ha descrito en la introducción, algunas de las modificaciones post-traduccionales de ER α podrían verse afectadas con la inhibición de PI3K y su efecto sobre Akt o sus dianas (Medunjanin et al. 2005). Sin embargo, no hay datos hasta el momento de que esas modificaciones post-traduccionales bloqueen la transcripción mediada por ER y su interacción con las secuencias específicas EREs.

Para analizar el efecto de la vía de activación de Akt hemos tratado de sobreexpresar componentes situados por debajo de ésta sobre una situación de inhibición de ERs en las neuronas en cultivo, es decir en neuronas tratadas con el compuesto ICI 182,780.

Así, primero de entre las dianas de Akt, nos centramos en la estabilización de β -catenina por su implicación en la arborización dendrítica y elongación axonal en neuronas de hipocampo (Yu and Malenka 2004) y por otra parte, en la actividad del complejo mTORC1, que recientemente se ha asociado a elongación axonal.

La posible repercusión de la regulación de β -catenina por estradiol en la morfología neuronal podría tener lugar por un lado por la estabilización de sus niveles, efecto observado en neuronas de corteza e hipocampo, y por otro por la regulación de su función en transcripción génica que hemos descrito en neuronas de corteza y N2a, y que tiene lugar a tiempos cortos del tratamiento de una manera transitoria.

Los resultados obtenidos con la sobreexpresión de β -catenina parecen excluir un posible papel de la acumulación de β -catenina en el efecto morfológico de estradiol. Los datos obtenidos con la expresión de β -catenina en cuanto a longitud axonal se refiere no presentan diferencias estadísticas respecto a cada control.

Nuestros resultados de la expresión de S33Y- β -catenina muestran una reducción leve de la longitud axonal de las neuronas a 3 DIV, que sin embargo no llega a presentar diferencias significativas con el control. Sobre estas neuronas que presentan una mayor función transcripcional de β -catenina, como comprobamos con la expresión de un gen diana: Axina 2, o la actividad transcripcional alta sobre el promotor TCF en células N2a, el bloqueo de receptores de estrógenos genera la misma reducción

morfológica que en el control. La longitud media axonal con S33Y- β cat +ICI es de 156,9 μ m que en comparación con ICI (133,34 μ m) no presenta variación.

Así, estos datos sugieren que la función nuclear de β -catenina por si sola no parece ser suficiente para un incremento en la extensión axonal en ausencia de ERs funcionales.

Para analizar la posible función de β -catenina en las membranas sobreexpresamos la forma de β -catenina sin modificar. A pesar de observar un tránsito de β -catenina a la fracción de membranas con la adición de estradiol en células N2a a tiempos cortos y del papel descrito en neuronas maduras en relación a arborización/elongación (Yu and Malenka 2004), no obtenemos ninguna recuperación con esta sobreexpresión en neuronas tratadas con ICI. No podemos descartar que el tratamiento de ICI suprima la función o expresión de algún otro componente necesario para esta posible función de β -catenina, sin embargo hemos comprobado que la expresión de los plásmidos no se ve afectada por la adición de ICI en ningún caso.

Nuestros datos difieren con los que se habían descrito para una forma de β -catenina con varias mutaciones en los residuos de fosforilación de GSK3 en neuronas de hipocampo. En éstas, se observaba un incremento en la arborización dendrítica de β -catenina no dependiente de la activación transcripcional (Yu and Malenka 2004). Sin embargo, los datos del grupo de Malenka se realizaron analizando neuronas de 14 DIV crecidas sobre una monocapa de astrocitos, en comparación con las nuestras cuyo máximo de tiempo analizado fue de 7 DIV y en ausencia de glía pudiendo ser éstas las razones de las diferencias obtenidas. Nuestros datos se apoyarían por otro lado con otros resultados en los que la estabilización de β -catenina resulta inhibitoria para la extensión neurítica en células PC12 diferenciadas (Votin et al. 2005) en donde sugieren una mayor formación del complejo β -catenina-APC en detrimento del complejo β -catenina-cadherinas por competición de ambos por los mismos repeticiones armadillo de β -catenina. Es necesario profundizar, en cualquier caso, en la posible implicación de la estabilización de β -catenina en las neuronas maduras, que como ha sido publicado se requiere a un nivel funcional mayor para la consolidación de la memoria (Maguschak and Ressler 2008), proceso para el cual los estrógenos ejercen también un efecto positivo.

En cuanto a la activación de mTORC1 por estradiol y la reducción axonal que se obtiene con el bloqueo de esta vía con la adición de rapamicina centramos nuestra atención en un intento de recuperación de la morfología obtenida con ICI. En la vía de activación de mTORC1 juega un papel esencial Rheb, y uno de los principales efectores de la vía es S6K (Kim et al. 2002), una aproximación es la sobreexpresión de estas proteínas en las neuronas tratadas con ICI.

Mientras que con la expresión de S6K1 no somos capaces de revertir la morfología hacia el control en neuronas tratadas con ICI (comparación de la longitud media axonal obtenida con S6K1+ICI de 150.47 μ m y cDNA3.1+ICI de 137.2 μ m), sí mejora cuando sobreexpresamos la proteína Rheb activa constitutiva. Con esta sobreexpresión conseguimos que los axones y dendritas presenten longitudes similares a las que encontramos en neuronas no tratadas, aun en presencia de ICI, hasta alcanzar longitudes que no difieren estadísticamente de los controles (la comparación entre las longitudes

axonales obtenidas con RhebQ64L+ICI (301.6 μ m) y cDNA3.1+ICI (137.2 μ m) muestra elevada diferencia estadística).

La proteína Rheb tiene algunos efectores directos además de mTORC1, entre ellos, la fosfolipasa D1 como se describe en algunos trabajos realizados en líneas celulares (Sun et al. 2008). La actividad de la fosfolipasa D1 tiene efectos neuritogénicos en precursores neuronales de rata (Yoon et al. 2006; Yoon et al. 2005).

El complejo mTORC1, además de S6K1, con la que no conseguimos obtener efecto positivo a diferencia de los datos obtenidos en otros trabajos en los que introducen la forma activa constitutiva de S6K1 (Morita et al. 2009), podría tener otras dianas interesantes para analizar en la morfología como la regulación del factor de elongación 4EBP-1, a través del cual se ha propuesto una función en la formación del axón en neuronas de hipocampo de rata durante la realización de este trabajo (Li et al. 2008) (Morita et al. 2009) en los que parece intervenir la traducción local de proteínas asociadas al citoesqueleto.

La activación de mTORC1 se ha relacionado también en trabajos previos con la modificación del citoesqueleto de actina y tubulina (Jiang and Yeung 2006) y la posible modificación de proteínas de unión a extremos más de microtúbulos como CLIP170 como posible diana de mTORC1 en fibroblastos.

Los datos existentes indican que el efecto positivo que juega la actividad de Rheb/mTORC1 en elongación axonal permite la elongación del axón incluso en presencia de LY. Comparando este resultado con el obtenido con estradiol y la capacidad de este de incrementar la actividad mTORC1, da pie a situar la señalización de E2-ER de forma que ésta tiene lugar desde la activación de PI3K y no directamente sobre mTORC1.

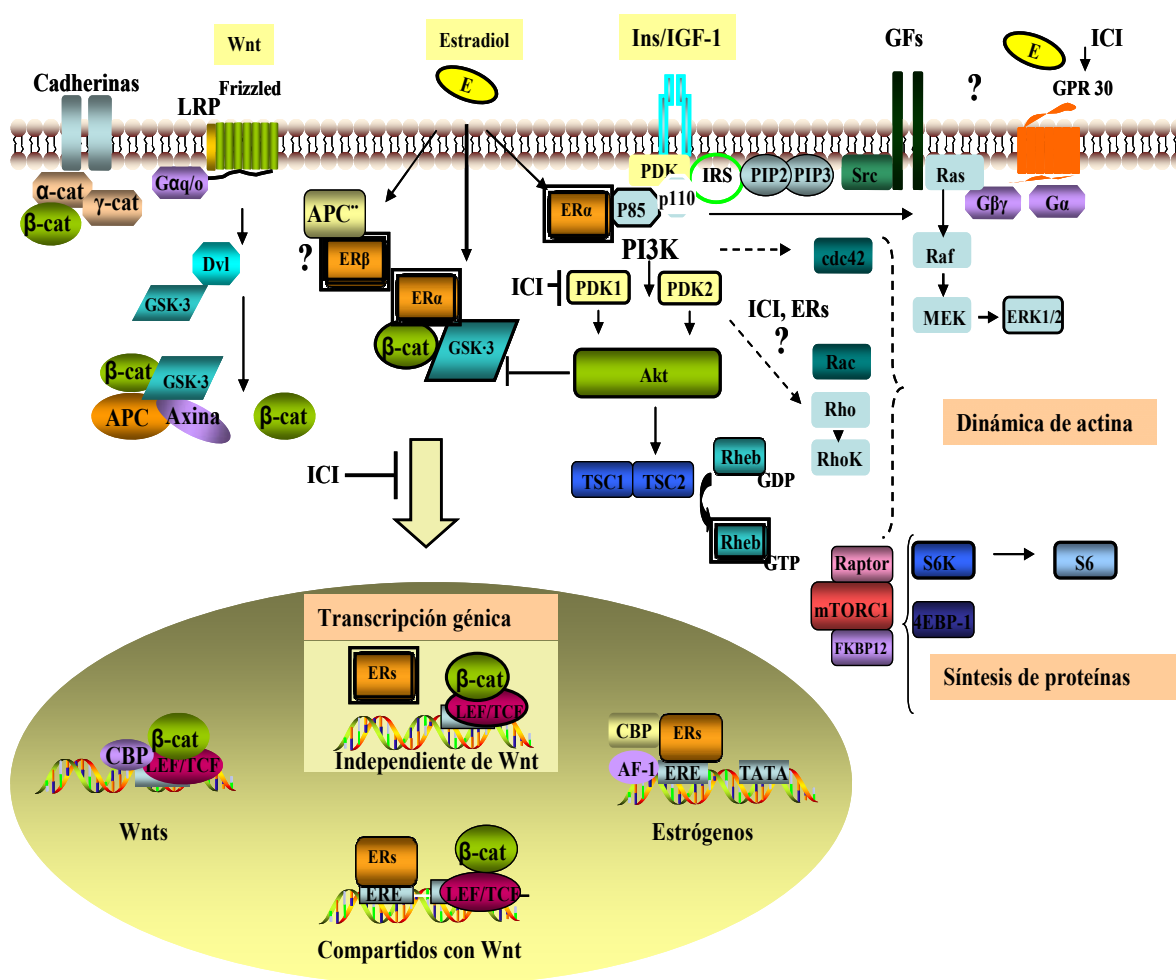
Es interesante destacar que la activación de la proteína S6 mediante la sobreexpresión de Rheb es sensiblemente diferente a la activación que supone la sobreexpresión de la proteína S6K1. En el análisis realizado mediante *western blot* de ambas condiciones se observa incremento en la fosforilación de S6, sin embargo el patrón de bandas obtenido es diferente en cada caso. La proteína S6 es fosforilada principalmente en cuatro residuos (Ser²³⁵, Ser²³⁶, Ser²⁴⁰, Ser²⁴⁴) localizados en su extremo C-terminal. El anticuerpo utilizado para detectar la forma fosforilada de S6 reconoce los residuos de Ser²³⁵ y Ser²³⁶ de la proteína S6. Las diferencias en la migración de la proteína S6 fosforilada sugiere una composición diferente de residuos fosfato con la sobreexpresión de RhebQ64L y con la sobreexpresión de S6K1, lo que podría indicar que parte de la proteína S6K1 introducida está siendo regulada negativamente.

Los tratamientos con rapamicina realizados sobre neuronas que sobreexpresan S6K1 reducen la elongación axonal al igual que ocurre en neuronas control. Este hecho, podría dar cuenta de una inhibición de Akt, bloqueando así la vía en un efecto de retro-alimentación negativa (Manning and Cantley 2007). Esta parece ser la explicación adecuada puesto que la exposición a rapamicina en

nuestras neuronas de hipocampo reduce notablemente la fosforilación en el residuo de Ser⁴⁷³ de Akt (datos no mostrados).

Con la introducción de la forma activa constitutiva de RhebQ64L en neuronas tratadas con ICI no sólo se consigue incremento en la longitud del axón sino también en la longitud de las dendritas (la comparación Rheb+ICI frente a cDNA3.1+ICI da lugar a una relación de longitud dendrítica de 1.6 veces). Con la inhibición de mTORC1 con rapamicina sólo se ve modificada la longitud axonal. Este otro punto que sugiere la divergencia de la señalización a partir de Rheb de manera independiente de mTORC1.

A modo de resumen, en el trabajo realizado hemos descrito en conjunto por tanto dos vías por las que revertir el bloqueo de ERs y sus consecuencias en morfología de la neurona: 1) la inhibición de RhoK y 2) la activación de Rheb. Ambos parecen convergir en la modulación del citoesqueleto y éste podría ser el mecanismo por el que se consigue la reversión.



Esquema 11. Resumen de las vías analizadas en respuesta a estradiol en neuronas. Se muestra tanto la hipótesis de trabajo por la cual la activación de Akt da lugar a la inhibición de GSK3 y activación de β -catenina por un lado de manera que existe una regulación génica mediada por estradiol y dependiente de TCFs, y por otro la activación de Rheb/mTORC1 que parece tener una función dirigida por ERs en la morfología neuronal. Se ha representado también la posible activación de MAPK a través de GPR-30, evento a tener en cuenta en posibles funciones en las neuronas maduras.

En el **esquema 11** se resumen las vías de señalización dependientes de ERs estudiadas, tanto en relación con la vía PI3K como la regulación de la función transcripcional de β -catenina en el núcleo como las que conllevarían la activación de la ruta Rheb/mTORC1. El estudio del receptor GPR-30 se incluye como candidato a futuros análisis. Se indican además las funciones que podrían ser moduladas con la activación de cada bloque de componentes.

Estradiol, Receptores de estrógenos y neuroprotección.

De las tres grandes funciones de los estrógenos en cerebro, que podemos clasificar como papel en: desarrollo, envejecimiento y neurodegeneración, hemos tratado de esclarecer las implicaciones de los receptores de estrógenos y algunas de sus vías de actuación durante la adquisición de la morfología neuronal, en la extensión del axón y las dendritas.

En nuestro trabajo hemos visto que durante el desarrollo de la neurona y la adquisición de su morfología es necesaria la actividad de los receptores de estrógenos. También a estadios tempranos del desarrollo neuronal tiene lugar la interacción de ERs con la función nuclear de β -catenina, en este caso, juntos podrían estar potenciando la expresión de genes de supervivencia, estructurales o adhesión de una manera diferencial respecto a la activación mediada por Wnts. En caso de la pérdida de ER α o ER β durante estas fases iniciales o del bloqueo de su función en cultivo, la neurona no se desarrolla por completo y se impide de igual manera la interacción con la función de β -catenina. El efecto morfológico es reemplazable por la sobre-activación de Rheb/mTORC1 y la inhibición de RhoK para el caso de reducción de los niveles de ER β .

En neuronas maduras, adquiriría importancia además de ER α y ER β , GPR-30. En estos estadios posteriores, los ERs parecen estar implicados en el desarrollo dendrítico y la formación de espinas dendríticas. Además del papel estructural, intervienen en la electrofisiología de la neurona al igual que GPR-30 descrito para neuronas hipotalámicas (Qiu et al. 2008). Resulta de gran interés ampliar el estudio de las funciones de los receptores de estrógenos y de la posible implicación de los mecanismos descritos en este trabajo a neuronas maduras y en procesos patológicos.

En el envejecimiento existe una pérdida de síntesis estrogénica en el organismo (Sherwin 1988) y en algunas condiciones también se modifica la expresión de los receptores de estrógenos (Ishunina and Swaab 2009). Esta disminución de las funciones dependientes de estrógenos podría potenciar la aparición de daño neuronal o la intensificación de la sintomatología de ciertas enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer o Parkinson. Así mismo, las diferentes formas de ERs expresadas en Alzheimer podrían determinar la capacidad de respuesta de dichos pacientes al tratamiento hormonal que controla en algunos casos la aparición de los síntomas cognitivos propios de estas enfermedades.

Entre las posibles aplicaciones de los mecanismos descritos situaríamos también el estudio de los mecanismos de estrógenos en la neuroprotección frente a diferentes estímulos tóxicos como la formación de radicales libres (peróxido de hidrógeno) y otras fuentes de estrés celular como la isquemia cerebral (Wise and Dubal 2000) o la toxicidad inducida por glutamato (Honda et al. 2000; Mendelowitsch et al. 2001).

El papel de estrógenos en enfermedades neurodegenerativas está siendo ampliamente estudiado por la gran diversidad de aplicaciones que presenta. Desde la reducción de procesos inflamatorios hasta la mejora de las funciones cognitivas. Por eso es importante entender el mecanismo molecular que siguen los ERs, tanto en condiciones fisiológicas como en condiciones patológicas. No debemos olvidar la capacidad de respuesta a estrógenos de las células gliales (astrocitos, oligodendrocitos principalmente por su abundancia) que modulan la respuesta de las neuronas al daño neuronal y a la presencia natural de estrógenos en cerebro, por ello suponen un linaje celular de interés a la hora de analizar la posible modulación de β -catenina por estradiol en este tipo celular o la posible interacción con la activación de mTORC1.

En resumen, nuestro trabajo ahonda en la función de los receptores de estrógenos y en la importancia que éstos adquieren en la diferenciación neuronal. Su función no sólo tiene lugar a través de la expresión génica dependiente de EREs sino que siguen múltiples mecanismos moleculares entre los que se sitúa su interacción con la vía PI3K. A partir de dicha activación hemos descrito los efectos que se desencadenan. Primero, hemos descrito que se activa una vía Akt/GSK3/ β -catenina con repercusión en la activación de genes dependientes del complejo β -catenina/TCFs. Esto daría opción a un grupo de genes activados por estradiol comunes a la vía Wnt, y también un grupo de genes activados de forma exclusiva por estradiol utilizando parte de la maquinaria de la vía Wnt. Segundo, hemos detectado la activación de Akt/mTORC1 con estradiol y que la actividad de Rheb/mTORC1 ejerce un papel importante en la adquisición de la morfología neuronal. Las isoformas de ER α y β parecen tener efecto solapante en la regulación de la función de β -catenina pero los complejos proteínicos en los que se encuentran difieren. Esto puede conferirles diferencias en sus funciones en morfología, como se ha descrito para la reversión de su bloqueo gracias a la adición del inhibidor de RhoK, que es efectivo solamente para la supresión de ER β .

Los datos que van obteniéndose de los mecanismos de acción de los receptores de estrógenos pueden llegar a ayudar a comprender mejor, paso a paso, en estudios futuros los efectos tan diversos que éstos que ejercen sobre las neuronas y sus funciones.

Gen ID	Ctrl AvsB	estr AvsB	wnt AvsB	Símbolo/Nombre del gen
mCG3067.1	2,308	1,337	2,198	Ndufab1 /NADH deshidrogenasa I
mCG16690.2	1,717	2,039	1,342	Plg/Plasminógeno
mCG108445.3	0,581	0	0,224	Hsf2/heat shock factor 2
mCG142223	0,569	-0,188	-0,632	Ly6g5c/lymphocyte antigen 6
mCG133573.2	0,526	-0,075	-0,446	Actg2/ γ actina
mCG118262	0,343	0,182	-0,092	Cacng6/canal de calcio dep.de voltaje γ
mCG21251.1	0,667	0,379	0,573	Cend1/ciclina D1
mCG129638.1	0,27	0,172	-0,163	Nmyc1/N-myc
NM_009237.1	0,386	-0,254	0,251	Sox3/SRY-box containing gene
mCG12474.1	-0,917	-0,324	0,074	Tle4/Transducin like enhancer 4
mCG129094.1	0,188	0,145	0,118	GSK3b/Glucógeno sintasa quinasa3 β
mCG1625.1	0,164	-0,06	0,183	Myc/ oncogen mielocitomatosis
mCG126170	0,074	0,625	-0,02	Dnase1/DNAasa I
mCG140787	-0,004	0,517	0,35	Dncic1/dineína citoplasmática
mCG15544.2	0,638	1,044	0,895	Amph/Amfifisina
mCG141417	-0,022	0,285	0,218	Tcf3/ factor de transcripción TCF-3
mCG126409	-0,173	0,25	0,102	Lrp8/ receptor LRP-8
mCG8383.2	-0,048	0,856	0,142	Ssh3/homólogo de Slingshot 3
mCG8617.3	-0,175	0,109	0,184	Cbln3/Cerebelina 3 precursor
mCG19243.2	-0,218	0,342	-0,784	Msi1h/Musashi homolog 1
mCG18510.2	-0,54	0,775	-0,907	Prosapip1/ProSAPiP1
mCG127576	-0,329	0,687	-0,315	Jund1/proto-oncogen JunD1
mCG10208.2	-2,842	-2,642	-3,395	Lef1/factor de transcripción LEF-1

Tabla 4. En la tabla se muestra una selección de genes que se ven modificados en presencia de estradiol y que son dependientes de LEF1 (marcados en verde). En amarillo se muestran destacados algunos de los genes que presentan pequeñas variaciones, en gris los genes cuya expresión es dependiente de LEF1 en estado basal y en rojo la disminución de expresión de LEF1 como consecuencia de la introducción de la forma delecionada de esta proteína. Los datos se muestran como la relación A frente a B, siendo A las células N2a-cDNA3.1 y B las células Δ 56LEF1-N2a. El dato numérico está expresado en $\log_2 R$.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES:

El objetivo general de este trabajo ha sido profundizar en el estudio de las funciones de los receptores de estrógenos y su incidencia en el desarrollo neuronal, hemos podido describir a lo largo de nuestros estudios que:

1- Mientras que la expresión de ER β tiene lugar en una forma única de proteína, la isoforma ER α se encuentra modificada de forma que da lugar a dos variantes de menor peso molecular que situamos en torno a 60KDa además de la correspondiente a la proteína sin modificar, de 66 KDa, en todos los tipos celulares testados.

2- Con respecto a la localización en las neuronas, hemos podido comprobar que tanto ER α como ER β se expresan en neuronas de corteza e hipocampo en cultivo, localizándose en el núcleo y a lo largo de toda la morfología neuronal. Los extremos en crecimiento de las neuritas (futuras dendritas y axón) son zonas de acumulación de ERs.

3- Hemos podido comprobar que los receptores de estrógenos promueven el desarrollo del axón y de las dendritas en neuronas de corteza e hipocampo. El antagonista de ERs, ICI, bloquea el desarrollo neuronal. Sin embargo, el bloqueo sostenido no impide la maduración axonal, analizada como la capacidad de generación del segmento inicial del axón en las neuronas mantenidas hasta 7 DIV.

4- Los resultados obtenidos con los interferentes para cada isoforma, tanto ER β como ER α indican que ambas isoformas son esenciales en la adquisición final de la morfología neuronal durante el desarrollo. Siendo la disminución de los niveles de ER β más efectiva y suficiente para obtener una morfología similar a la obtenida con el antagonista ICI.

5- La adición de estradiol promueve la activación de Akt, que se detecta por la fosforilación de sus dos residuos reguladores, Ser⁴⁷³ y Thr³⁰⁸ en neuronas primarias. De ellos, sólo se bloquea con ICI la fosforilación sobre el residuo de Thr³⁰⁸.

6- En las neuronas de corteza embrionaria mantenidas de 2 a 3 días en cultivo y en la línea celular N2a, el estradiol inhibe la actividad de GSK3 α/β y como consecuencia de ello, β -catenina se estabiliza. Además, los receptores de estrógenos α y β forman un complejo con GSK3 α/β y β -catenina en N2a y en corteza.

7- Hemos podido comprobar que la estabilización de β -catenina por estradiol genera activación transcripcional, tanto en sistemas de células transfectadas como en neuronas primarias de ratones transgénicos.

8- Dicha activación transcripcional viene mediada por la generación/incremento de un complejo con el miembro de la familia TCF, LEF-1.

9- En las células N2a, la inducción de la expresión de genes que responden a β -catenina activados por estradiol dependen de la proteína LEF-1. De tal manera que la generación de una línea estable para un mutante de ésta, ha permitido identificar genes que, respondiendo a estradiol (por activación o inhibición), son sensibles a la mutación de LEF-1. El análisis comparativo de estos patrones de expresión indican que los genes regulados por estradiol-sensibles a LEF-1, difiere en gran medida del obtenido a través de la activación por Wnt3a. Entre los genes activados por estradiol existe un subgrupo que depende de la formación del complejo β -catenina/LEF1 sobre el promotor.

10- En paralelo, hemos podido comprobar que el estradiol, a través de la vía de Akt, activa la ruta de mTORC1/S6K. La adición de estradiol da lugar a la activación de S6K que puede ser bloqueada tanto por ICI como por rapamicina, sugiriendo una activación de mTORC1 por los receptores de estrógenos en neuronas de hipocampo.

11- El bloqueo en la morfología neuronal inducido con el antagonista de los receptores de estrógenos, ICI, puede ser revertido con una inhibición de la actividad de RhoK, o potenciado con la despolimerización de actina con el uso de citocalasina D.

12-. A nivel de las vías descritas en este trabajo, ni la sobreexpresión de S6K1 ni la disponibilidad de β -catenina estable o en altos niveles de expresión, son capaces de mejorar la morfología tras el bloqueo de los receptores de estrógenos. Sin embargo, la actividad de Rheb revierte la longitud axonal en neuronas tratadas con ICI hasta alcanzar longitudes equivalentes a las de las neuronas control. Esto indicaría que al menos parte de la señalización citosólica medida por estradiol es importante en la morfogénesis neuronal.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Aberle H, Bauer A, Stappert J, Kispert A, Kemler R. 1997. beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *The EMBO journal* 16(13):3797-3804.
- Acconcia F, Ascenzi P, Bocedi A, Spisni E, Tomasi V, Trentalance A, Visca P, Marino M. 2005. Palmitoylation-dependent estrogen receptor alpha membrane localization: regulation by 17beta-estradiol. *Molecular biology of the cell* 16(1):231-237.
- Acconcia F, Ascenzi P, Fabozzi G, Visca P, Marino M. 2004. S-palmitoylation modulates human estrogen receptor-alpha functions. *Biochemical and biophysical research communications* 316(3):878-883.
- Akama KT, McEwen BS. 2003. Estrogen stimulates postsynaptic density-95 rapid protein synthesis via the Akt/protein kinase B pathway. *J Neurosci* 23(6):2333-2339.
- Alfinito PD, Chen X, Atherton J, Cosmi S, Deecher DC. 2008. ICI 182,780 penetrates brain and hypothalamic tissue and has functional effects in the brain after systemic dosing. *Endocrinology* 149(10):5219-5226.
- Angers S, Moon RT. 2009. Proximal events in Wnt signal transduction. *Nature reviews* 10(7):468-477.
- Anolik JH, Klinge CM, Hilf R, Bambara RA. 1995. Cooperative binding of estrogen receptor to DNA depends on spacing of binding sites, flanking sequence, and ligand. *Biochemistry* 34(8):2511-2520.
- Aoki M, Hecht A, Kruse U, Kemler R, Vogt PK. 1999. Nuclear endpoint of Wnt signaling: neoplastic transformation induced by transactivating lymphoid-enhancing factor 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96(1):139-144.
- Avila J, Lucas JJ, Perez M, Hernandez F. 2004. Role of tau protein in both physiological and pathological conditions. *Physiological reviews* 84(2):361-384.
- Azcoitia I, Sierra A, Veiga S, Honda S, Harada N, Garcia-Segura LM. 2001. Brain aromatase is neuroprotective. *Journal of neurobiology* 47(4):318-329.
- Baas PW, Deitch JS, Black MM, Banker GA. 1988. Polarity orientation of microtubules in hippocampal neurons: uniformity in the axon and nonuniformity in the dendrite. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85(21):8335-8339.
- Bai X, Ma D, Liu A, Shen X, Wang QJ, Liu Y, Jiang Y. 2007. Rheb activates mTOR by antagonizing its endogenous inhibitor, FKBP38. *Science (New York, NY)* 318(5852):977-980.
- Beato M, Klug J. 2000. Steroid hormone receptors: an update. *Hum Reprod Update* 6(3):225-236.
- Behl C, Moosmann B, Manthey D, Heck S. 2000. The female sex hormone oestrogen as neuroprotectant: activities at various levels. *Novartis Foundation symposium* 230:221-234; discussion 234-228.
- Behrens J, von Kries JP, Kuhl M, Bruhn L, Wedlich D, Grosschedl R, Birchmeier W. 1996. Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature* 382(6592):638-642.
- Benetti R, Copetti T, Dell'Orso S, Melloni E, Brancolini C, Monte M, Schneider C. 2005. The calpain system is involved in the constitutive regulation of beta-catenin signaling functions. *The Journal of biological chemistry* 280(23):22070-22080.
- Bhanot P, Brink M, Samos CH, Hsieh JC, Wang Y, Macke JP, Andrew D, Nathans J, Nusse R. 1996. A new member of the frizzled family from *Drosophila* functions as a Wingless receptor. *Nature* 382(6588):225-230.
- Bhat RV, Budd Haeberlein SL, Avila J. 2004. Glycogen synthase kinase 3: a drug target for CNS therapies. *Journal of neurochemistry* 89(6):1313-1317.
- Bhat RV, Shanley J, Correll MP, Fieles WE, Keith RA, Scott CW, Lee CM. 2000. Regulation and localization of tyrosine216 phosphorylation of glycogen synthase kinase-3beta in cellular and animal models of neuronal degeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(20):11074-11079.
- Bienz M, Clevers H. 2000. Linking colorectal cancer to Wnt signaling. *Cell* 103(2):311-320.
- Birge SJ, Mortel KF. 1997. Estrogen and the treatment of Alzheimer's disease. *The American journal of medicine* 103(3A):36S-45S.
- Bjornstrom L, Sjoberg M. 2002. Signal transducers and activators of transcription as downstream targets of nongenomic estrogen receptor actions. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)* 16(10):2202-2214.
- Bologa CG, Revankar CM, Young SM, Edwards BS, Arterburn JB, Kiselyov AS, Parker MA, Tkachenko SE, Savchuck NP, Sklar LA, Oprea TI, Prossnitz ER. 2006. Virtual and biomolecular screening converge on a selective agonist for GPR30. *Nature chemical biology* 2(4):207-212.

- Boon WC, Diepstraten J, van der Burg J, Jones ME, Simpson ER, van den Buuse M. 2005. Hippocampal NMDA receptor subunit expression and watermaze learning in estrogen deficient female mice. *Brain Res Mol Brain Res* 140(1-2):127-132.
- Boulware MI, Weick JP, Becklund BR, Kuo SP, Groth RD, Mermelstein PG. 2005. Estradiol activates group I and II metabotropic glutamate receptor signaling, leading to opposing influences on cAMP response element-binding protein. *J Neurosci* 25(20):5066-5078.
- Bradke F, Dotti CG. 1999. The role of local actin instability in axon formation. *Science (New York, NY)* 283(5409):1931-1934.
- Brailoiu E, Dun SL, Brailoiu GC, Mizuo K, Sklar LA, Oprea TI, Prossnitz ER, Dun NJ. 2007. Distribution and characterization of estrogen receptor G protein-coupled receptor 30 in the rat central nervous system. *The Journal of endocrinology* 193(2):311-321.
- Brantjes H, Barker N, van Es J, Clevers H. 2002. TCF: Lady Justice casting the final verdict on the outcome of Wnt signalling. *Biological chemistry* 383(2):255-261.
- Brantjes H, Roose J, van De Wetering M, Clevers H. 2001. All Tcf HMG box transcription factors interact with Groucho-related co-repressors. *Nucleic acids research* 29(7):1410-1419.
- Brueggemeier RW, Hackett JC, Diaz-Cruz ES. 2005. Aromatase inhibitors in the treatment of breast cancer. *Endocr Rev* 26(3):331-345.
- Brzozowski AM, Pike AC, Dauter Z, Hubbard RE, Bonn T, Engstrom O, Ohman L, Greene GL, Gustafsson JA, Carlquist M. 1997. Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Nature* 389(6652):753-758.
- Cadigan KM, Nusse R. 1997. Wnt signaling: a common theme in animal development. *Genes & development* 11(24):3286-3305.
- Cailleau R, Young R, Olive M, Reeves WJ, Jr. 1974. Breast tumor cell lines from pleural effusions. *J Natl Cancer Inst* 53(3):661-674.
- Cardona-Gomez GP, Mendez P, DonCarlos LL, Azcoitia I, Garcia-Segura LM. 2001. Interactions of estrogens and insulin-like growth factor-I in the brain: implications for neuroprotection. *Brain Res Brain Res Rev* 37(1-3):320-334.
- Cardona-Gomez GP, Mendez P, DonCarlos LL, Azcoitia I, Garcia-Segura LM. 2002a. Interactions of estrogen and insulin-like growth factor-I in the brain: molecular mechanisms and functional implications. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 83(1-5):211-217.
- Cardona-Gomez GP, Mendez P, Garcia-Segura LM. 2002b. Synergistic interaction of estradiol and insulin-like growth factor-I in the activation of PI3K/Akt signaling in the adult rat hypothalamus. *Brain Res Mol Brain Res* 107(1):80-88.
- Cardona-Gomez P, Perez M, Avila J, Garcia-Segura LM, Wandosell F. 2004. Estradiol inhibits GSK3 and regulates interaction of estrogen receptors, GSK3, and beta-catenin in the hippocampus. *Molecular and cellular neurosciences* 25(3):363-373.
- Carlson LE, Sherwin BB. 1998. Steroid hormones, memory and mood in a healthy elderly population. *Psychoneuroendocrinology* 23(6):583-603.
- Carmeci C, Thompson DA, Ring HZ, Francke U, Weigel RJ. 1997. Identification of a gene (GPR30) with homology to the G-protein-coupled receptor superfamily associated with estrogen receptor expression in breast cancer. *Genomics* 45(3):607-617.
- Castoria G, Migliaccio A, Bilancio A, Di Domenico M, de Falco A, Lombardi M, Fiorentino R, Varricchio L, Barone MV, Auricchio F. 2001. PI3-kinase in concert with Src promotes the S-phase entry of oestradiol-stimulated MCF-7 cells. *The EMBO journal* 20(21):6050-6059.
- Castro AF, Rebhun JF, Clark GJ, Quilliam LA. 2003. Rheb binds tuberous sclerosis complex 2 (TSC2) and promotes S6 kinase activation in a rapamycin- and farnesylation-dependent manner. *The Journal of biological chemistry* 278(35):32493-32496.
- Cavailles V, Dauvois S, L'Horsset F, Lopez G, Hoare S, Kushner PJ, Parker MG. 1995. Nuclear factor RIP140 modulates transcriptional activation by the estrogen receptor. *The EMBO journal* 14(15):3741-3751.
- Clark DE, Poteet-Smith CE, Smith JA, Lannigan DA. 2001. Rsk2 allosterically activates estrogen receptor alpha by docking to the hormone-binding domain. *The EMBO journal* 20(13):3484-3494.
- Cole AR, Causeret F, Yadirgi G, Hastie CJ, McLauchlan H, McManus EJ, Hernandez F, Eickholt BJ, Nikolic M, Sutherland C. 2006. Distinct priming kinases contribute to differential regulation of collapsin response mediator proteins by glycogen synthase kinase-3 in vivo. *The Journal of biological chemistry* 281(24):16591-16598.
- Cong F, Varmus H. 2004. Nuclear-cytoplasmic shuttling of Axin regulates subcellular localization of beta-catenin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(9):2882-2887.
- Craig AM, Banker G. 1994. Neuronal polarity. *Annual review of neuroscience* 17:267-310.

- Cross DA, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings BA. 1995. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* 378(6559):785-789.
- Chappell SA, Johnson SM, Shaw JA, Walker RA. 2000. Expression of oestrogen receptor alpha variants in non-malignant breast and early invasive breast carcinomas. *The Journal of pathology* 192(2):159-165.
- Chen D, Pace PE, Coombes RC, Ali S. 1999. Phosphorylation of human estrogen receptor alpha by protein kinase A regulates dimerization. *Molecular and cellular biology* 19(2):1002-1015.
- Chen D, Riedl T, Washbrook E, Pace PE, Coombes RC, Egly JM, Ali S. 2000. Activation of estrogen receptor alpha by S118 phosphorylation involves a ligand-dependent interaction with TFIID and participation of CDK7. *Molecular cell* 6(1):127-137.
- Chen JQ, Delannoy M, Cooke C, Yager JD. 2004. Mitochondrial localization of ERalpha and ERbeta in human MCF7 cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 286(6):E1011-1022.
- Choi JH, Adames NR, Chan TF, Zeng C, Cooper JA, Zheng XF. 2000. TOR signaling regulates microtubule structure and function. *Curr Biol* 10(14):861-864.
- Choi JH, Bertram PG, Drenan R, Carvalho J, Zhou HH, Zheng XF. 2002. The FKBP12-rapamycin-associated protein (FRAP) is a CLIP-170 kinase. *EMBO reports* 3(10):988-994.
- Chu S, Nishi Y, Yanase T, Nawata H, Fuller PJ. 2004. Transrepression of estrogen receptor beta signaling by nuclear factor-kappaB in ovarian granulosa cells. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)* 18(8):1919-1928.
- D'Astous M, Morissette M, Di Paolo T. 2004. Effect of estrogen receptor agonists treatment in MPTP mice: evidence of neuroprotection by an ER alpha agonist. *Neuropharmacology* 47(8):1180-1188.
- Da Silva JS, Medina M, Zuliani C, Di Nardo A, Witke W, Dotti CG. 2003. RhoA/ROCK regulation of neuriteogenesis via profilin IIa-mediated control of actin stability. *The Journal of cell biology* 162(7):1267-1279.
- Danielian PS, White R, Hoare SA, Fawell SE, Parker MG. 1993. Identification of residues in the estrogen receptor that confer differential sensitivity to estrogen and hydroxytamoxifen. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)* 7(2):232-240.
- Daniels DL, Weis WI. 2005. Beta-catenin directly displaces Groucho/TLE repressors from Tcf/Lef in Wnt-mediated transcription activation. *Nature structural & molecular biology* 12(4):364-371.
- Dauvois S, Danielian PS, White R, Parker MG. 1992. Antiestrogen ICI 164,384 reduces cellular estrogen receptor content by increasing its turnover. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89(9):4037-4041.
- Dauvois S, White R, Parker MG. 1993. The antiestrogen ICI 182780 disrupts estrogen receptor nucleocytoplasmic shuttling. *Journal of cell science* 106 (Pt 4):1377-1388.
- DasGupta R, Fuchs E. 1999. Multiple roles for activated LEF/TCF transcription complexes during hair follicle development and differentiation. *Development (Cambridge, England)* 126(20):4557-4568.
- De Ferrari GV, Moon RT. 2006. The ups and downs of Wnt signaling in prevalent neurological disorders. *Oncogene* 25(57):7545-7553.
- Delcommenne M, Tan C, Gray V, Rue L, Woodgett J, Dedhar S. 1998. Phosphoinositide-3-OH kinase-dependent regulation of glycogen synthase kinase 3 and protein kinase B/AKT by the integrin-linked kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95(19):11211-11216.
- Denger S, Reid G, Kos M, Flouriot G, Parsch D, Brand H, Korach KS, Sonntag-Buck V, Gannon F. 2001. ERalpha gene expression in human primary osteoblasts: evidence for the expression of two receptor proteins. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)* 15(12):2064-2077.
- Dotti CG, Sullivan CA, Banker GA. 1988. The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture. *J Neurosci* 8(4):1454-1468.
- Dubal DB, Shughrue PJ, Wilson ME, Merchenthaler I, Wise PM. 1999. Estradiol modulates bcl-2 in cerebral ischemia: a potential role for estrogen receptors. *J Neurosci* 19(15):6385-6393.
- Dupont S, Krust A, Gansmuller A, Dierich A, Chambon P, Mark M. 2000. Effect of single and compound knockouts of estrogen receptors alpha (ERalpha) and beta (ERbeta) on mouse reproductive phenotypes. *Development (Cambridge, England)* 127(19):4277-4291.
- Embi N, Rylatt DB, Cohen P. 1980. Glycogen synthase kinase-3 from rabbit skeletal muscle. Separation from cyclic-AMP-dependent protein kinase and phosphorylase kinase. *European journal of biochemistry / FEBS* 107(2):519-527.
- Evans RM. 1988. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science (New York, NY)* 240(4854):889-895.
- Fagotto F, Gluck U, Gumbiner BM. 1998. Nuclear localization signal-independent and importin/karyopherin-independent nuclear import of beta-catenin. *Curr Biol* 8(4):181-190.

- Filardo EJ, Thomas P. 2005. GPR30: a seven-transmembrane-spanning estrogen receptor that triggers EGF release. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 16(8):362-367.
- Fillit H, Weinreb H, Cholst I, Luine V, McEwen B, Amador R, Zabriskie J. 1986. Observations in a preliminary open trial of estradiol therapy for senile dementia-Alzheimer's type. *Psychoneuroendocrinology* 11(3):337-345.
- Fink G, Sumner BE, Rosie R, Grace O, Quinn JP. 1996. Estrogen control of central neurotransmission: effect on mood, mental state, and memory. *Cellular and molecular neurobiology* 16(3):325-344.
- Fitzpatrick SL, Funkhouser JM, Sindoni DM, Stevis PE, Deecher DC, Bapat AR, Merchenthaler I, Frail DE. 1999. Expression of estrogen receptor-beta protein in rodent ovary. *Endocrinology* 140(6):2581-2591.
- Fliss AE, Benzeno S, Rao J, Caplan AJ. 2000. Control of estrogen receptor ligand binding by Hsp90. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 72(5):223-230.
- Flouriot G, Brand H, Denger S, Metivier R, Kos M, Reid G, Sonntag-Buck V, Gannon F. 2000. Identification of a new isoform of the human estrogen receptor-alpha (hER-alpha) that is encoded by distinct transcripts and that is able to repress hER-alpha activation function 1. *The EMBO journal* 19(17):4688-4700.
- Frame S, Cohen P. 2001. GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery. *The Biochemical journal* 359(Pt 1):1-16.
- Frame S, Cohen P, Biondi RM. 2001. A common phosphate binding site explains the unique substrate specificity of GSK3 and its inactivation by phosphorylation. *Molecular cell* 7(6):1321-1327.
- Frasor J, Stossi F, Danes JM, Komm B, Lyttle CR, Katzenellenbogen BS. 2004. Selective estrogen receptor modulators: discrimination of agonistic versus antagonistic activities by gene expression profiling in breast cancer cells. *Cancer research* 64(4):1522-1533.
- Freeman MP, Smith KW, Freeman SA, McElroy SL, Kmetz GE, Wright R, Keck PE, Jr. 2002. The impact of reproductive events on the course of bipolar disorder in women. *J Clin Psychiatry* 63(4):284-287.
- Fugger HN, Foster TC, Gustafsson J, Rissman EF. 2000. Novel effects of estradiol and estrogen receptor alpha and beta on cognitive function. *Brain research* 883(2):258-264.
- Funakoshi T, Yanai A, Shinoda K, Kawano MM, Mizukami Y. 2006. G protein-coupled receptor 30 is an estrogen receptor in the plasma membrane. *Biochemical and biophysical research communications* 346(3):904-910.
- Galceran J, Miyashita-Lin EM, Devaney E, Rubenstein JL, Grosschedl R. 2000. Hippocampus development and generation of dentate gyrus granule cells is regulated by LEF1. *Development (Cambridge, England)* 127(3):469-482.
- Gao WQ, Hatten ME. 1993. Neuronal differentiation rescued by implantation of Weaver granule cell precursors into wild-type cerebellar cortex. *Science (New York, NY)* 260(5106):367-369.
- Gan XQ, Wang JY, Xi Y, Wu ZL, Li YP, Li L. 2008. Nuclear Dvl, c-Jun, beta-catenin, and TCF form a complex leading to stabilization of beta-catenin-TCF interaction. *The Journal of cell biology* 180(6):1087-1100.
- Garcia-Segura LM, Cardona-Gomez P, Naftolin F, Chowen JA. 1998. Estradiol upregulates Bcl-2 expression in adult brain neurons. *Neuroreport* 9(4):593-597.
- Garcia C, Calvo E, Nieto A. 2007. The transcription factor SOX17 is involved in the transcriptional control of the uteroglobin gene in rabbit endometrium. *J Cell Biochem* 102(3):665-679.
- Garrido JJ, Giraud P, Carlier E, Fernandes F, Moussif A, Fache MP, Debanne D, Dargent B. 2003. A targeting motif involved in sodium channel clustering at the axonal initial segment. *Science (New York, NY)* 300(5628):2091-2094.
- Gehler S, Gallo G, Veien E, Letourneau PC. 2004. p75 neurotrophin receptor signaling regulates growth cone filopodial dynamics through modulating RhoA activity. *J Neurosci* 24(18):4363-4372.
- Goni-Oliver P, Lucas JJ, Avila J, Hernandez F. 2007. N-terminal cleavage of GSK-3 by calpain: a new form of GSK-3 regulation. *The Journal of biological chemistry* 282(31):22406-22413.
- Gonzalez-Billault C, Del Rio JA, Urena JM, Jimenez-Mateos EM, Barallobre MJ, Pascual M, Pujadas L, Simo S, Torre AL, Gavin R, Wandosell F, Soriano E, Avila J. 2005. A role of MAP1B in Reelin-dependent neuronal migration. *Cereb Cortex* 15(8):1134-1145.
- Gonzalez-Billault C, Jimenez-Mateos EM, Caceres A, Diaz-Nido J, Wandosell F, Avila J. 2004. Microtubule-associated protein 1B function during normal development, regeneration, and pathological conditions in the nervous system. *Journal of neurobiology* 58(1):48-59.
- Gonzalez-Sancho JM, Aguilera O, Garcia JM, Pendas-Franco N, Pena C, Cal S, Garcia de Herreros A, Bonilla F, Munoz A. 2005. The Wnt antagonist DICKKOPF-1 gene is a downstream target of beta-catenin/TCF and is downregulated in human colon cancer. *Oncogene* 24(6):1098-1103.

- Gonzalez-Scarano F, Baltuch G. 1999. Microglia as mediators of inflammatory and degenerative diseases. *Annual review of neuroscience* 22:219-240.
- Gonzalez M, Cabrera-Socorro A, Perez-Garcia CG, Fraser JD, Lopez FJ, Alonso R, Meyer G. 2007. Distribution patterns of estrogen receptor alpha and beta in the human cortex and hippocampus during development and adulthood. *The Journal of comparative neurology* 503(6):790-802.
- Goslin K, Banker G. 1989. Experimental observations on the development of polarity by hippocampal neurons in culture. *The Journal of cell biology* 108(4):1507-1516.
- Gould E, Woolley CS, Frankfurt M, McEwen BS. 1990. Gonadal steroids regulate dendritic spine density in hippocampal pyramidal cells in adulthood. *J Neurosci* 10(4):1286-1291.
- Green PS, Simpkins JW. 2000. Neuroprotective effects of estrogens: potential mechanisms of action. *Int J Dev Neurosci* 18(4-5):347-358.
- Green PS, Yang SH, Simpkins JW. 2000. Neuroprotective effects of phenolic A ring oestrogens. *Novartis Foundation symposium* 230:202-213; discussion 213-220.
- Greene GL, Gilna P, Waterfield M, Baker A, Hort Y, Shine J. 1986. Sequence and expression of human estrogen receptor complementary DNA. *Science (New York, NY)* 231(4742):1150-1154.
- Greenfield JP, Leung LW, Cai D, Kaasik K, Gross RS, Rodriguez-Boulan E, Greengard P, Xu H. 2002. Estrogen lowers Alzheimer beta-amyloid generation by stimulating trans-Golgi network vesicle biogenesis. *The Journal of biological chemistry* 277(14):12128-12136.
- Greger JG, Fursov N, Cooch N, McLarney S, Freedman LP, Edwards DP, Cheskis BJ. 2007. Phosphorylation of MNAR promotes estrogen activation of phosphatidylinositol 3-kinase. *Molecular and cellular biology* 27(5):1904-1913.
- Groden J, Thliveris A, Samowitz W, Carlson M, Gelbert L, Albertsen H, Joslyn G, Stevens J, Spirio L, Robertson M, et al. 1991. Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene. *Cell* 66(3):589-600.
- Gu Q, Moss RL. 1996. 17 beta-Estradiol potentiates kainate-induced currents via activation of the cAMP cascade. *J Neurosci* 16(11):3620-3629.
- Guo W, Jiang H, Gray V, Dedhar S, Rao Y. 2007. Role of the integrin-linked kinase (ILK) in determining neuronal polarity. *Developmental biology* 306(2):457-468.
- Gustafsson JA. 1998. Therapeutic potential of selective estrogen receptor modulators. *Current opinion in chemical biology* 2(4):508-511.
- Hall JM, Couse JF, Korach KS. 2001. The multifaceted mechanisms of estradiol and estrogen receptor signaling. *The Journal of biological chemistry* 276(40):36869-36872.
- Hanstein B, Djahansouzi S, Dall P, Beckmann MW, Bender HG. 2004. Insights into the molecular biology of the estrogen receptor define novel therapeutic targets for breast cancer. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies* 150(3):243-255.
- Hart MJ, de los Santos R, Albert IN, Rubinfeld B, Polakis P. 1998. Downregulation of beta-catenin by human Axin and its association with the APC tumor suppressor, beta-catenin and GSK3 beta. *Curr Biol* 8(10):573-581.
- Hatanaka Y, Murakami F. 2002. In vitro analysis of the origin, migratory behavior, and maturation of cortical pyramidal cells. *The Journal of comparative neurology* 454(1):1-14.
- He TC, Sparks AB, Rago C, Hermeking H, Zawel L, da Costa LT, Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler KW. 1998. Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science (New York, NY)* 281(5382):1509-1512.
- Henttu PM, Kalkhoven E, Parker MG. 1997. AF-2 activity and recruitment of steroid receptor coactivator 1 to the estrogen receptor depend on a lysine residue conserved in nuclear receptors. *Molecular and cellular biology* 17(4):1832-1839.
- Hernandez F, Avila J. 2007. Tauopathies. *Cell Mol Life Sci* 64(17):2219-2233.
- Hestiantoro A, Swaab DF. 2004. Changes in estrogen receptor-alpha and -beta in the infundibular nucleus of the human hypothalamus are related to the occurrence of Alzheimer's disease neuropathology. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 89(4):1912-1925.
- Hirabayashi Y, Itoh Y, Tabata H, Nakajima K, Akiyama T, Masuyama N, Gotoh Y. 2004. The Wnt/beta-catenin pathway directs neuronal differentiation of cortical neural precursor cells. *Development (Cambridge, England)* 131(12):2791-2801.
- Hoeflich KP, Luo J, Rubie EA, Tsao MS, Jin O, Woodgett JR. 2000. Requirement for glycogen synthase kinase-3beta in cell survival and NF-kappaB activation. *Nature* 406(6791):86-90.
- Hojo Y, Hattori TA, Enami T, Furukawa A, Suzuki K, Ishii HT, Mukai H, Morrison JH, Janssen WG, Kominami S, Harada N, Kimoto T, Kawato S. 2004. Adult male rat hippocampus synthesizes estradiol from pregnenolone by cytochromes P45017alpha and P450 aromatase localized in neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(3):865-870.

- Honda K, Sawada H, Kihara T, Urushitani M, Nakamizo T, Akaike A, Shimohama S. 2000. Phosphatidylinositol 3-kinase mediates neuroprotection by estrogen in cultured cortical neurons. *Journal of neuroscience research* 60(3):321-327.
- Horiguchi K, Hanada T, Fukui Y, Chishti AH. 2006. Transport of PIP3 by GAKIN, a kinesin-3 family protein, regulates neuronal cell polarity. *The Journal of cell biology* 174(3):425-436.
- Hovanes K, Li TW, Munguia JE, Truong T, Milovanovic T, Lawrence Marsh J, Holcombe RF, Waterman ML. 2001. Beta-catenin-sensitive isoforms of lymphoid enhancer factor-1 are selectively expressed in colon cancer. *Nat Genet* 28(1):53-57.
- Howell A, Osborne CK, Morris C, Wakeling AE. 2000. ICI 182,780 (Faslodex): development of a novel, "pure" antiestrogen. *Cancer* 89(4):817-825.
- Huber TJ, Rollnik J, Wilhelms J, von zur Muhlen A, Emrich HM, Schneider U. 2001. Estradiol levels in psychotic disorders. *Psychoneuroendocrinology* 26(1):27-35.
- Hughes K, Nikolakaki E, Plyte SE, Totty NF, Woodgett JR. 1993. Modulation of the glycogen synthase kinase-3 family by tyrosine phosphorylation. *The EMBO journal* 12(2):803-808.
- Ikeda S, Kishida S, Yamamoto H, Murai H, Koyama S, Kikuchi A. 1998. Axin, a negative regulator of the Wnt signaling pathway, forms a complex with GSK-3 β and beta-catenin and promotes GSK-3 β -dependent phosphorylation of beta-catenin. *The EMBO journal* 17(5):1371-1384.
- Inestrosa NC, Toledo EM. 2008. The role of Wnt signaling in neuronal dysfunction in Alzheimer's Disease. *Molecular neurodegeneration* 3:9.
- Inoki K, Corradetti MN, Guan KL. 2005a. Dysregulation of the TSC-mTOR pathway in human disease. *Nat Genet* 37(1):19-24.
- Inoki K, Ouyang H, Li Y, Guan KL. 2005b. Signaling by target of rapamycin proteins in cell growth control. *Microbiol Mol Biol Rev* 69(1):79-100.
- Inoki K, Li Y, Zhu T, Wu J, Guan KL. 2002. TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nature cell biology* 4(9):648-657.
- Isensee J, Meoli L, Zazzu V, Nabzdyk C, Witt H, Soewarto D, Effertz K, Fuchs H, Gailus-Durner V, Busch D, Adler T, de Angelis MH, Irgang M, Otto C, Noppinger PR. 2009. Expression pattern of G protein-coupled receptor 30 in LacZ reporter mice. *Endocrinology* 150(4):1722-1730.
- Ishunina TA, Swaab DF. 2008. Estrogen receptor-alpha splice variants in the human brain. *Gynecol Endocrinol* 24(2):93-98.
- Ishunina TA, Swaab DF. 2009. Hippocampal estrogen receptor-alpha splice variant TADDI in the human brain in aging and Alzheimer's disease. *Neuroendocrinology* 89(2):187-199.
- Ivanova T, Mendez P, Garcia-Segura LM, Beyer C. 2002. Rapid stimulation of the PI3-kinase/Akt signalling pathway in developing midbrain neurones by oestrogen. *Journal of neuroendocrinology* 14(1):73-79.
- Jaeschke A, Hartkamp J, Saitoh M, Roworth W, Nobukuni T, Hodges A, Sampson J, Thomas G, Lamb R. 2002. Tuberous sclerosis complex tumor suppressor-mediated S6 kinase inhibition by phosphatidylinositide-3-OH kinase is mTOR independent. *The Journal of cell biology* 159(2):217-224.
- Jaffe AB, Hall A. 2005. Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annual review of cell and developmental biology* 21:247-269.
- Jamora C, DasGupta R, Kocieniewski P, Fuchs E. 2003. Links between signal transduction, transcription and adhesion in epithelial bud development. *Nature* 422(6929):317-322.
- Jensen EV, Suzuki T, Kawashima T, Stumpf WE, Jungblut PW, DeSombre ER. 1968. A two-step mechanism for the interaction of estradiol with rat uterus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 59(2):632-638.
- Jho EH, Zhang T, Domon C, Joo CK, Freund JN, Costantini F. 2002. Wnt/beta-catenin/Tcf signaling induces the transcription of Axin2, a negative regulator of the signaling pathway. *Molecular and cellular biology* 22(4):1172-1183.
- Jiang H, Guo W, Liang X, Rao Y. 2005. Both the establishment and the maintenance of neuronal polarity require active mechanisms: critical roles of GSK-3 β and its upstream regulators. *Cell* 120(1):123-135.
- Jiang H, Vogt PK. 2008. Constitutively active Rheb induces oncogenic transformation. *Oncogene* 27(43):5729-5740.
- Jiang X, Yeung RS. 2006. Regulation of microtubule-dependent protein transport by the TSC2/mammalian target of rapamycin pathway. *Cancer research* 66(10):5258-5269.
- Kaech S, Banker G. 2006. Culturing hippocampal neurons. *Nature protocols* 1(5):2406-2415.
- Kalaria RN. 1999. Microglia and Alzheimer's disease. *Curr Opin Hematol* 6(1):15-24.
- Kato S, Endoh H, Masuhiro Y, Kitamoto T, Uchiyama S, Sasaki H, Masushige S, Gotoh Y, Nishida E, Kawashima H, Metzger D, Chambon P. 1995. Activation of the estrogen receptor through

- phosphorylation by mitogen-activated protein kinase. *Science* (New York, NY 270(5241):1491-1494.
- Katzenellenbogen BS, Frasor J. 2004. Therapeutic targeting in the estrogen receptor hormonal pathway. *Semin Oncol* 31(1 Suppl 3):28-38.
- Kelly MJ, Ronnekleiv OK. 2009. Control of CNS neuronal excitability by estrogens via membrane-initiated signaling. *Molecular and cellular endocrinology* 308(1-2):17-25.
- Kim DH, Sarbassov DD, Ali SM, King JE, Latek RR, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Sabatini DM. 2002. mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell* 110(2):163-175.
- Kim DH, Sarbassov DD, Ali SM, Latek RR, Guntur KV, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Sabatini DM. 2003. GbetaL, a positive regulator of the rapamycin-sensitive pathway required for the nutrient-sensitive interaction between raptor and mTOR. *Molecular cell* 11(4):895-904.
- Kim MY, Woo EM, Chong YT, Homenko DR, Kraus WL. 2006. Acetylation of estrogen receptor alpha by p300 at lysines 266 and 268 enhances the deoxyribonucleic acid binding and transactivation activities of the receptor. *Molecular endocrinology* (Baltimore, Md 20(7):1479-1493.
- Kitagawa M, Hatakeyama S, Shirane M, Matsumoto M, Ishida N, Hattori K, Nakamichi I, Kikuchi A, Nakayama K, Nakayama K. 1999. An F-box protein, FWD1, mediates ubiquitin-dependent proteolysis of beta-catenin. *The EMBO journal* 18(9):2401-2410.
- Klinge CM, Bambara RA, Hilf R. 1992a. Antiestrogen-liganded estrogen receptor interaction with estrogen responsive element DNA in vitro. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 43(4):249-262.
- Klinge CM, Peale FV, Jr., Hilf R, Bambara RA, Zain S. 1992b. Cooperative estrogen receptor interaction with consensus or variant estrogen responsive elements in vitro. *Cancer research* 52(5):1073-1081.
- Komuro H, Yacubova E, Yacubova E, Rakic P. 2001. Mode and tempo of tangential cell migration in the cerebellar external granular layer. *J Neurosci* 21(2):527-540.
- Korinek V, Barker N, Willert K, Molenaar M, Roose J, Wagenaar G, Markman M, Lamers W, Destree O, Clevers H. 1998. Two members of the Tcf family implicated in Wnt/beta-catenin signaling during embryogenesis in the mouse. *Molecular and cellular biology* 18(3):1248-1256.
- Kretz O, Fester L, Wehrenberg U, Zhou L, Brauckmann S, Zhao S, Prange-Kiel J, Naumann T, Jarry H, Frotscher M, Rune GM. 2004. Hippocampal synapses depend on hippocampal estrogen synthesis. *J Neurosci* 24(26):5913-5921.
- Krieghoff E, Behrens J, Mayr B. 2006. Nucleo-cytoplasmic distribution of beta-catenin is regulated by retention. *Journal of cell science* 119(Pt 7):1453-1463.
- Krust A, Green S, Argos P, Kumar V, Walter P, Bornert JM, Chambon P. 1986. The chicken oestrogen receptor sequence: homology with v-erbA and the human oestrogen and glucocorticoid receptors. *The EMBO journal* 5(5):891-897.
- Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Haggblad J, Nilsson S, Gustafsson JA. 1997. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology* 138(3):863-870.
- Kuiper GG, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA. 1996. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93(12):5925-5930.
- Kunda P, Paglini G, Quiroga S, Kosik K, Cáceres A. 2001. Evidence for the involvement of Tiam1 in axon formation. *J Neurosci* 21(7):2361-2372.
- Kushner PJ, Agard DA, Greene GL, Scanlan TS, Shiau AK, Uht RM, Webb P. 2000. Estrogen receptor pathways to AP-1. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 74(5):311-317.
- Kouzmenko AP, Takeyama K, Ito S, Furutani T, Sawatsubashi S, Maki A, Suzuki E, Kawasaki Y, Akiyama T, Tabata T, Kato S. 2004. Wnt/beta-catenin and estrogen signaling converge in vivo. *The Journal of biological chemistry* 279(39):40255-40258.
- Kwon CH, Zhu X, Zhang J, Baker SJ. 2003. mTor is required for hypertrophy of Pten-deficient neuronal soma in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(22):12923-12928.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259):680-685.
- Leblanc K, Sexton E, Parent S, Belanger G, Dery MC, Boucher V, Asselin E. 2007. Effects of 4-hydroxytamoxifen, raloxifene and ICI 182 780 on survival of uterine cancer cell lines in the presence and absence of exogenous estrogens. *Int J Oncol* 30(2):477-487.

- Le Romancer M, Treilleux I, Leconte N, Robin-Lespinasse Y, Sentis S, Bouchekioua-Bouzaghrou K, Goddard S, Gobert-Gosse S, Corbo L. 2008. Regulation of estrogen rapid signaling through arginine methylation by PRMT1. *Molecular cell* 31(2):212-221.
- Leuner B, Shors TJ. 2004. New spines, new memories. *Molecular neurobiology* 29(2):117-130.
- Li C, Brake WG, Romeo RD, Dunlop JC, Gordon M, Buzescu R, Magarinos AM, Allen PB, Greengard P, Luine V, McEwen BS. 2004. Estrogen alters hippocampal dendritic spine shape and enhances synaptic protein immunoreactivity and spatial memory in female mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(7):2185-2190.
- Li L, Haynes MP, Bender JR. 2003. Plasma membrane localization and function of the estrogen receptor alpha variant (ER46) in human endothelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(8):4807-4812.
- Li R, Shen Y, Yang LB, Lue LF, Finch C, Rogers J. 2000. Estrogen enhances uptake of amyloid beta-protein by microglia derived from the human cortex. *Journal of neurochemistry* 75(4):1447-1454.
- Liu F, Day M, Muniz LC, Bitran D, Arias R, Revilla-Sanchez R, Grauer S, Zhang G, Kelley C, Pulito V, Sung A, Mervis RF, Navarra R, Hirst WD, Reinhart PH, Marquis KL, Moss SJ, Pangalos MN, Brandon NJ. 2008. Activation of estrogen receptor-beta regulates hippocampal synaptic plasticity and improves memory. *Nature neuroscience* 11(3):334-343.
- Li YH, Werner H, Puschel AW. 2008. Rheb and mTOR regulate neuronal polarity through Rap1B. *The Journal of biological chemistry* 283(48):33784-33792.
- Loewith R, Jacinto E, Wulschleger S, Loberg A, Crespo JL, Bonenfant D, Oppliger W, Jenoe P, Hall MN. 2002. Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control. *Molecular cell* 10(3):457-468.
- Long X, Lin Y, Ortiz-Vega S, Yonezawa K, Avruch J. 2005. Rheb binds and regulates the mTOR kinase. *Curr Biol* 15(8):702-713.
- Longo M, Brama M, Marino M, Bernardini S, Korach KS, Wetsel WC, Scandurra R, Faraggiana T, Spera G, Baron R, Teti A, Migliaccio S. 2004. Interaction of estrogen receptor alpha with protein kinase C alpha and c-Src in osteoblasts during differentiation. *Bone* 34(1):100-111.
- Lucas FR, Salinas PC. 1997. WNT-7a induces axonal remodeling and increases synapsin I levels in cerebellar neurons. *Developmental biology* 192(1):31-44.
- Luo L. 2000. Rho GTPases in neuronal morphogenesis. *Nat Rev Neurosci* 1(3):173-180.
- Lustig B, Jerchow B, Sachs M, Weiler S, Pietsch T, Karsten U, van de Wetering M, Clevers H, Schlag PM, Birchmeier W, Behrens J. 2002. Negative feedback loop of Wnt signaling through upregulation of conductin/axin2 in colorectal and liver tumors. *Molecular and cellular biology* 22(4):1184-1193.
- Maguschak KA, Ressler KJ. 2008. Beta-catenin is required for memory consolidation. *Nature neuroscience* 11(11):1319-1326.
- Manavathi B, Acconcia F, Rayala SK, Kumar R. 2006. An inherent role of microtubule network in the action of nuclear receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(43):15981-15986.
- Manly JJ, Merchant CA, Jacobs DM, Small SA, Bell K, Ferin M, Mayeux R. 2000. Endogenous estrogen levels and Alzheimer's disease among postmenopausal women. *Neurology* 54(4):833-837.
- Manning BD, Cantley LC. 2007. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* 129(7):1261-1274.
- Manning BD, Tee AR, Logsdon MN, Blenis J, Cantley LC. 2002. Identification of the tuberous sclerosis complex-2 tumor suppressor gene product tuberlin as a target of the phosphoinositide 3-kinase/akt pathway. *Molecular cell* 10(1):151-162.
- Marino M, Ascenzi P, Acconcia F. 2006. S-palmitoylation modulates estrogen receptor alpha localization and functions. *Steroids* 71(4):298-303.
- Martinez-Salas E, Linney E, Hassell J, DePamphilis ML. 1989. The need for enhancers in gene expression first appears during mouse development with formation of the zygotic nucleus. *Genes & development* 3(10):1493-1506.
- Matsuda K, Sakamoto H, Mori H, Hosokawa K, Kawamura A, Itose M, Nishi M, Prossnitz ER, Kawata M. 2008. Expression and intracellular distribution of the G protein-coupled receptor 30 in rat hippocampal formation. *Neuroscience letters* 441(1):94-99.
- McEwen BS, Tanapat P, Weiland NG. 1999. Inhibition of dendritic spine induction on hippocampal CA1 pyramidal neurons by a nonsteroidal estrogen antagonist in female rats. *Endocrinology* 140(3):1044-1047.
- McKenna NJ, Xu J, Nawaz Z, Tsai SY, Tsai MJ, O'Malley BW. 1999. Nuclear receptor coactivators: multiple enzymes, multiple complexes, multiple functions. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 69(1-6):3-12.

- Medunjanin S, Hermani A, De Servi B, Grisouard J, Rincke G, Mayer D. 2005. Glycogen synthase kinase-3 interacts with and phosphorylates estrogen receptor alpha and is involved in the regulation of receptor activity. *The Journal of biological chemistry* 280(38):33006-33014.
- Meegan MJ, Lloyd DG. 2003. Advances in the science of estrogen receptor modulation. *Curr Med Chem* 10(3):181-210.
- Menager C, Arimura N, Fukata Y, Kaibuchi K. 2004. PIP3 is involved in neuronal polarization and axon formation. *Journal of neurochemistry* 89(1):109-118.
- Mendez P, Azcoitia I, Garcia-Segura LM. 2003. Estrogen receptor alpha forms estrogen-dependent multimolecular complexes with insulin-like growth factor receptor and phosphatidylinositol 3-kinase in the adult rat brain. *Brain Res Mol Brain Res* 112(1-2):170-176.
- Mendez P, Azcoitia I, Garcia-Segura LM. 2005. Interdependence of oestrogen and insulin-like growth factor-I in the brain: potential for analysing neuroprotective mechanisms. *The Journal of endocrinology* 185(1):11-17.
- Mendez P, Garcia-Segura LM. 2006. Phosphatidylinositol 3-kinase and glycogen synthase kinase 3 regulate estrogen receptor-mediated transcription in neuronal cells. *Endocrinology* 147(6):3027-3039.
- Mendelowitsch A, Ritz MF, Ros J, Langemann H, Gratzl O. 2001. 17beta-Estradiol reduces cortical lesion size in the glutamate excitotoxicity model by enhancing extracellular lactate: a new neuroprotective pathway. *Brain research* 901(1-2):230-236.
- Meyers MJ, Sun J, Carlson KE, Marriner GA, Katzenellenbogen BS, Katzenellenbogen JA. 2001. Estrogen receptor-beta potency-selective ligands: structure-activity relationship studies of diarylpropionitriles and their acetylene and polar analogues. *J Med Chem* 44(24):4230-4251.
- Migliaccio A, Di Domenico M, Castoria G, de Falco A, Bontempo P, Nola E, Auricchio F. 1996. Tyrosine kinase/p21ras/MAP-kinase pathway activation by estradiol-receptor complex in MCF-7 cells. *The EMBO journal* 15(6):1292-1300.
- Milner TA, Ayoola K, Drake CT, Herrick SP, Tabori NE, McEwen BS, Warriar S, Alves SE. 2005. Ultrastructural localization of estrogen receptor beta immunoreactivity in the rat hippocampal formation. *The Journal of comparative neurology* 491(2):81-95.
- Miller JR, Moon RT. 1997. Analysis of the signaling activities of localization mutants of beta-catenin during axis specification in *Xenopus*. *The Journal of cell biology* 139(1):229-243.
- Miranda RC, Sohrabji F, Toran-Allerand D. 1994. Interactions of estrogen with the neurotrophins and their receptors during neural development. *Horm Behav* 28(4):367-375.
- Miyoshi Y, Nagase H, Ando H, Horii A, Ichii S, Nakatsuru S, Aoki T, Miki Y, Mori T, Nakamura Y. 1992. Somatic mutations of the APC gene in colorectal tumors: mutation cluster region in the APC gene. *Hum Mol Genet* 1(4):229-233.
- Moffat J, Grueneberg DA, Yang X, Kim SY, Kloepper AM, Hinkle G, Piqani B, Eisenhaure TM, Luo B, Grenier JK, Carpenter AE, Foo SY, Stewart SA, Stockwell BR, Hacohen N, Hahn WC, Lander ES, Sabatini DM, Root DE. 2006. A lentiviral RNAi library for human and mouse genes applied to an arrayed viral high-content screen. *Cell* 124(6):1283-1298.
- Montano MM, Muller V, Trobaugh A, Katzenellenbogen BS. 1995. The carboxy-terminal F domain of the human estrogen receptor: role in the transcriptional activity of the receptor and the effectiveness of antiestrogens as estrogen antagonists. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)* 9(7):814-825.
- Moore JT, McKee DD, Slentz-Kesler K, Moore LB, Jones SA, Horne EL, Su JL, Kliewer SA, Lehmann JM, Willson TM. 1998. Cloning and characterization of human estrogen receptor beta isoforms. *Biochemical and biophysical research communications* 247(1):75-78.
- Moreno-Flores MT, Martin-Aparicio E, Martin-Bermejo MJ, Agudo M, McMahon S, Avila J, Diaz-Nido J, Wandosell F. 2003. Semaphorin 3C preserves survival and induces neuritogenesis of cerebellar granule neurons in culture. *Journal of neurochemistry* 87(4):879-890.
- Morin PJ, Sparks AB, Korinek V, Barker N, Clevers H, Vogelstein B, Kinzler KW. 1997. Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. *Science (New York, NY)* 275(5307):1787-1790.
- Morita T, Sobue K. 2009. Specification of neuronal polarity regulated by local translation of CRMP2 and tau via the mTOR-p70S6K pathway. *The Journal of biological chemistry*.
- Mukai H, Tsurugizawa T, Ogiue-Ikeda M, Murakami G, Hojo Y, Ishii H, Kimoto T, Kawato S. 2006. Local neurosteroid production in the hippocampus: influence on synaptic plasticity of memory. *Neuroendocrinology* 84(4):255-263.
- Mulnard RA, Cotman CW, Kawas C, van Dyck CH, Sano M, Doody R, Koss E, Pfeiffer E, Jin S, Gamst A, Grundman M, Thomas R, Thal LJ. 2000. Estrogen replacement therapy for treatment of mild to moderate Alzheimer disease: a randomized controlled trial. *Alzheimer's Disease Cooperative Study. Jama* 283(8):1007-1015.

- Murakami G, Tanabe N, Ishii HT, Ogiue-Ikeda M, Tsurugizawa T, Mukai H, Hojo Y, Takata N, Furukawa A, Kimoto T, Kawato S. 2006. Role of cytochrome p450 in synaptocrinology: endogenous estrogen synthesis in the brain hippocampus. *Drug metabolism reviews* 38(3):353-369.
- Murase S, Mosser E, Schuman EM. 2002. Depolarization drives beta-Catenin into neuronal spines promoting changes in synaptic structure and function. *Neuron* 35(1):91-105.
- Murphy DD, Segal M. 1996. Regulation of dendritic spine density in cultured rat hippocampal neurons by steroid hormones. *J Neurosci* 16(13):4059-4068.
- Naldini L, Blomer U, Gage FH, Trono D, Verma IM. 1996. Efficient transfer, integration, and sustained long-term expression of the transgene in adult rat brains injected with a lentiviral vector. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93(21):11382-11388.
- Nilsen J, Diaz Brinton R. 2003. Mechanism of estrogen-mediated neuroprotection: regulation of mitochondrial calcium and Bcl-2 expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(5):2842-2847.
- Nishimura T, Kato K, Yamaguchi T, Fukata Y, Ohno S, Kaibuchi K. 2004. Role of the PAR-3-KIF3 complex in the establishment of neuronal polarity. *Nature cell biology* 6(4):328-334.
- Nishimura T, Yamaguchi T, Kato K, Yoshizawa M, Nabeshima Y, Ohno S, Hoshino M, Kaibuchi K. 2005. PAR-6-PAR-3 mediates Cdc42-induced Rac activation through the Rac GEFs STEF/Tiam1. *Nature cell biology* 7(3):270-277.
- Nishio M, Kuroki Y, Watanabe Y. 2004. Subcellular localization of estrogen receptor beta in mouse hippocampus. *Neuroscience letters* 355(1-2):109-112.
- Noctor SC, Martinez-Cerdeno V, Ivic L, Kriegstein AR. 2004. Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases. *Nature neuroscience* 7(2):136-144.
- Noel SD, Keen KL, Baumann DI, Filardo EJ, Terasawa E. 2009. Involvement of G protein-coupled receptor 30 (GPR30) in rapid action of estrogen in primate LHRH neurons. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)* 23(3):349-359.
- Nunez A, Carro E, Torres-Aleman I. 2003. Insulin-like growth factor I modifies electrophysiological properties of rat brain stem neurons. *Journal of neurophysiology* 89(6):3008-3017.
- Nusse R. 1997. A versatile transcriptional effector of Wntless signaling. *Cell* 89(3):321-323.
- Oliva AA, Jr., Atkins CM, Copenagle L, Banker GA. 2006. Activated c-Jun N-terminal kinase is required for axon formation. *J Neurosci* 26(37):9462-9470.
- Offner H, Polanczyk M. 2006. A potential role for estrogen in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1089:343-372.
- Osterlund MK, Gustafsson JA, Keller E, Hurd YL. 2000. Estrogen receptor beta (ERbeta) messenger ribonucleic acid (mRNA) expression within the human forebrain: distinct distribution pattern to ERalpha mRNA. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 85(10):3840-3846.
- Otto C, Fuchs I, Kauselmann G, Kern H, Zevnik B, Andreasen P, Schwarz G, Altmann H, Klewer M, Schoor M, Vonk R, Fritzemeier KH. 2009. GPR30 does not mediate estrogenic responses in reproductive organs in mice. *Biology of reproduction* 80(1):34-41.
- Packard MG, Kohlmaier JR, Alexander GM. 1996. Posttraining intrahippocampal estradiol injections enhance spatial memory in male rats: interaction with cholinergic systems. *Behav Neurosci* 110(3):626-632.
- Paech K, Webb P, Kuiper GG, Nilsson S, Gustafsson J, Kushner PJ, Scanlan TS. 1997. Differential ligand activation of estrogen receptors ERalpha and ERbeta at AP1 sites. *Science (New York, NY)* 277(5331):1508-1510.
- Palay SL, Sotelo C, Peters A, Orkand PM. 1968. The axon hillock and the initial segment. *The Journal of cell biology* 38(1):193-201.
- Park KK, Liu K, Hu Y, Smith PD, Wang C, Cai B, Xu B, Connolly L, Kramvis I, Sahin M, He Z. 2008. Promoting axon regeneration in the adult CNS by modulation of the PTEN/mTOR pathway. *Science (New York, NY)* 322(5903):963-966.
- Patrone C, Andersson S, Korhonen L, Lindholm D. 1999. Estrogen receptor-dependent regulation of sensory neuron survival in developing dorsal root ganglion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96(19):10905-10910.
- Peinado H, Olmeda D, Cano A. 2007. Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nat Rev Cancer* 7(6):415-428.

- Perez Martinez M, Garcia C, Lopez de Haro MS, Nieto A. 1996. Interactions of progesterone-dependent endometrial nuclear factors with the promoter of the rabbit uteroglobin gene. *Arch Biochem Biophys* 333(1):12-18.
- Peruzzi F, Prisco M, Dews M, Salomoni P, Grassilli E, Romano G, Calabretta B, Baserga R. 1999. Multiple signaling pathways of the insulin-like growth factor 1 receptor in protection from apoptosis. *Molecular and cellular biology* 19(10):7203-7215.
- Phillips SM, Sherwin BB. 1992. Effects of estrogen on memory function in surgically menopausal women. *Psychoneuroendocrinology* 17(5):485-495.
- Pietras RJ, Szego CM. 1977. Specific binding sites for oestrogen at the outer surfaces of isolated endometrial cells. *Nature* 265(5589):69-72.
- Pike AC, Brzozowski AM, Hubbard RE, Bonn T, Thorsell AG, Engstrom O, Ljunggren J, Gustafsson JA, Carlquist M. 1999. Structure of the ligand-binding domain of oestrogen receptor beta in the presence of a partial agonist and a full antagonist. *The EMBO journal* 18(17):4608-4618.
- Pike CJ. 1999. Estrogen modulates neuronal Bcl-xL expression and beta-amyloid-induced apoptosis: relevance to Alzheimer's disease. *Journal of neurochemistry* 72(4):1552-1563.
- Pikuleva IA. 2006. Cholesterol-metabolizing cytochromes P450. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 34(4):513-520.
- Plattner F, Angelo M, Giese KP. 2006. The roles of cyclin-dependent kinase 5 and glycogen synthase kinase 3 in tau hyperphosphorylation. *The Journal of biological chemistry* 281(35):25457-25465.
- Potter CJ, Pedraza LG, Xu T. 2002. Akt regulates growth by directly phosphorylating Tsc2. *Nature cell biology* 4(9):658-665.
- Pozzo-Miller LD, Inoue T, Murphy DD. 1999. Estradiol increases spine density and NMDA-dependent Ca²⁺ transients in spines of CA1 pyramidal neurons from hippocampal slices. *Journal of neurophysiology* 81(3):1404-1411.
- Pratt WB, Toft DO. 1997. Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocr Rev* 18(3):306-360.
- Prossnitz ER, Oprea TI, Sklar LA, Arterburn JB. 2008. The ins and outs of GPR30: a transmembrane estrogen receptor. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 109(3-5):350-353.
- Qiu J, Bosch MA, Tobias SC, Grandy DK, Scanlan TS, Ronnekleiv OK, Kelly MJ. 2003. Rapid signaling of estrogen in hypothalamic neurons involves a novel G-protein-coupled estrogen receptor that activates protein kinase C. *J Neurosci* 23(29):9529-9540.
- Qiu J, Bosch MA, Tobias SC, Krust A, Graham SM, Murphy SJ, Korach KS, Chambon P, Scanlan TS, Ronnekleiv OK, Kelly MJ. 2006. A G-protein-coupled estrogen receptor is involved in hypothalamic control of energy homeostasis. *J Neurosci* 26(21):5649-5655.
- Qiu J, Ronnekleiv OK, Kelly MJ. 2008. Modulation of hypothalamic neuronal activity through a novel G-protein-coupled estrogen membrane receptor. *Steroids* 73(9-10):985-991.
- Ray S, Xu F, Wang H, Das SK. 2008. Cooperative control via lymphoid enhancer factor 1/T cell factor 3 and estrogen receptor-alpha for uterine gene regulation by estrogen. *Molecular endocrinology* (Baltimore, Md) 22(5):1125-1140.
- Razandi M, Alton G, Pedram A, Ghonshani S, Webb P, Levin ER. 2003. Identification of a structural determinant necessary for the localization and function of estrogen receptor alpha at the plasma membrane. *Molecular and cellular biology* 23(5):1633-1646.
- Razmara A, Duckles SP, Krause DN, Procaccio V. 2007. Estrogen suppresses brain mitochondrial oxidative stress in female and male rats. *Brain research* 1176:71-81.
- Reid G, Hubner MR, Metivier R, Brand H, Denger S, Manu D, Beaudouin J, Ellenberg J, Gannon F. 2003. Cyclic, proteasome-mediated turnover of unliganded and liganded ERalpha on responsive promoters is an integral feature of estrogen signaling. *Molecular cell* 11(3):695-707.
- Resnick SM, Metter EJ, Zonderman AB. 1997. Estrogen replacement therapy and longitudinal decline in visual memory. A possible protective effect? *Neurology* 49(6):1491-1497.
- Revankar CM, Cimino DF, Sklar LA, Arterburn JB, Prossnitz ER. 2005. A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. *Science (New York, NY)* 307(5715):1625-1630.
- Riento K, Ridley AJ. 2003. Rocks: multifunctional kinases in cell behaviour. *Nature reviews* 4(6):446-456.
- Rios-Doria J, Kuefer R, Ethier SP, Day ML. 2004. Cleavage of beta-catenin by calpain in prostate and mammary tumor cells. *Cancer research* 64(20):7237-7240.
- Robel P, Baulieu EE. 1994. Neurosteroids Biosynthesis and function. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 5(1):1-8.
- Roelink H, Nusse R. 1991. Expression of two members of the Wnt family during mouse development--restricted temporal and spatial patterns in the developing neural tube. *Genes & development* 5(3):381-388.

- Rogatsky I, Trowbridge JM, Garabedian MJ. 1999. Potentiation of human estrogen receptor alpha transcriptional activation through phosphorylation of serines 104 and 106 by the cyclin A-CDK2 complex. *The Journal of biological chemistry* 274(32):22296-22302.
- Roose J, Clevers H. 1999. TCF transcription factors: molecular switches in carcinogenesis. *Biochimica et biophysica acta* 1424(2-3):M23-37.
- Roose J, Huls G, van Beest M, Moerer P, van der Horn K, Goldschmeding R, Logtenberg T, Clevers H. 1999. Synergy between tumor suppressor APC and the beta-catenin-Tcf4 target Tcf1. *Science* (New York, NY 285(5435):1923-1926.
- Ropero AB, Eghbali M, Minosyan TY, Tang G, Toro L, Stefani E. 2006. Heart estrogen receptor alpha: distinct membrane and nuclear distribution patterns and regulation by estrogen. *Journal of molecular and cellular cardiology* 41(3):496-510.
- Rosin-Arbesfeld R, Cliffe A, Brabletz T, Bienz M. 2003. Nuclear export of the APC tumour suppressor controls beta-catenin function in transcription. *The EMBO journal* 22(5):1101-1113.
- Rosso SB, Sussman D, Wynshaw-Boris A, Salinas PC. 2005. Wnt signaling through Dishevelled, Rac and JNK regulates dendritic development. *Nature neuroscience* 8(1):34-42.
- Roura S, Miravet S, Piedra J, Garcia de Herreros A, Dunach M. 1999. Regulation of E-cadherin/Catenin association by tyrosine phosphorylation. *The Journal of biological chemistry* 274(51):36734-36740.
- Rubinfeld B, Robbins P, El-Gamil M, Albert I, Porfiri E, Polakis P. 1997. Stabilization of beta-catenin by genetic defects in melanoma cell lines. *Science* (New York, NY 275(5307):1790-1792.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* (New York, NY 239(4839):487-491.
- Sakamoto H, Matsuda K, Hosokawa K, Nishi M, Morris JF, Prossnitz ER, Kawata M. 2007. Expression of G protein-coupled receptor-30, a G protein-coupled membrane estrogen receptor, in oxytocin neurons of the rat paraventricular and supraoptic nuclei. *Endocrinology* 148(12):5842-5850.
- Salinas PC, Fletcher C, Copeland NG, Jenkins NA, Nusse R. 1994. Maintenance of Wnt-3 expression in Purkinje cells of the mouse cerebellum depends on interactions with granule cells. *Development* (Cambridge, England) 120(5):1277-1286.
- Sanchez AM, Flamini MI, Fu XD, Mannella P, Giretti MS, Goglia L, Genazzani AR, Simoncini T. 2009. Rapid signaling of estrogen to WAVE1 and moesin controls neuronal spine formation via the actin cytoskeleton. *Molecular endocrinology* (Baltimore, Md 23(8):1193-1202.
- Sanchez-Ponce D, Tapia M, Munoz A, Garrido JJ. 2008. New role of IKK alpha/beta phosphorylated I kappa B alpha in axon outgrowth and axon initial segment development. *Molecular and cellular neurosciences* 37(4):832-844.
- Sanchez-Ponce D, Tapia M, Munoz A, Garrido JJ. 2008. New role of IKK alpha/beta phosphorylated I kappa B alpha in axon outgrowth and axon initial segment development. *Molecular and cellular neurosciences* 37(4):832-844.
- Savaskan E, Olivieri G, Meier F, Ravid R, Muller-Spahn F. 2001. Hippocampal estrogen beta-receptor immunoreactivity is increased in Alzheimer's disease. *Brain research* 908(2):113-119.
- Sayas CL, Avila J, Wandosell F. 2002. Regulation of neuronal cytoskeleton by lysophosphatidic acid: role of GSK-3. *Biochimica et biophysica acta* 1582(1-3):144-153.
- Sayas CL, Moreno-Flores MT, Avila J, Wandosell F. 1999. The neurite retraction induced by lysophosphatidic acid increases Alzheimer's disease-like Tau phosphorylation. *The Journal of biological chemistry* 274(52):37046-37052.
- Scobie GA, Macpherson S, Millar MR, Groome NP, Romana PG, Saunders PT. 2002. Human oestrogen receptors: differential expression of ER alpha and beta and the identification of ER beta variants. *Steroids* 67(12):985-992.
- Schupf N, Lee JH, Wei M, Pang D, Chace C, Cheng R, Zigman WB, Tycko B, Silverman W. 2008. Estrogen receptor-alpha variants increase risk of Alzheimer's disease in women with Down syndrome. *Dementia and geriatric cognitive disorders* 25(5):476-482.
- Schwend T, Gustafsson JA. 2006. False positives in MALDI-TOF detection of ERbeta in mitochondria. *Biochemical and biophysical research communications* 343(3):707-711.
- Sharma C, Pradeep A, Wong L, Rana A, Rana B. 2004. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation can regulate beta-catenin levels via a proteasome-mediated and adenomatous polyposis coli-independent pathway. *The Journal of biological chemistry* 279(34):35583-35594.
- Shelanski ML, Gaskin F, Cantor CR. 1973. Microtubule assembly in the absence of added nucleotides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 70(3):765-768.

- Sherwin BB. 1988. Estrogen and/or androgen replacement therapy and cognitive functioning in surgically menopausal women. *Psychoneuroendocrinology* 13(4):345-357.
- Shi B, Liang J, Yang X, Wang Y, Zhao Y, Wu H, Sun L, Zhang Y, Chen Y, Li R, Zhang Y, Hong M, Shang Y. 2007. Integration of estrogen and Wnt signaling circuits by the polycomb group protein EZH2 in breast cancer cells. *Molecular and cellular biology* 27(14):5105-5119.
- Shi SH, Cheng T, Jan LY, Jan YN. 2004. APC and GSK-3 β are involved in mPar3 targeting to the nascent axon and establishment of neuronal polarity. *Curr Biol* 14(22):2025-2032.
- Shi SH, Jan LY, Jan YN. 2003. Hippocampal neuronal polarity specified by spatially localized mPar3/mPar6 and PI 3-kinase activity. *Cell* 112(1):63-75.
- Shimizu H, Julius MA, Giarre M, Zheng Z, Brown AM, Kitajewski J. 1997. Transformation by Wnt family proteins correlates with regulation of beta-catenin. *Cell Growth Differ* 8(12):1349-1358.
- Singh M, Setalo G, Jr., Guan X, Warren M, Toran-Allerand CD. 1999. Estrogen-induced activation of mitogen-activated protein kinase in cerebral cortical explants: convergence of estrogen and neurotrophin signaling pathways. *J Neurosci* 19(4):1179-1188.
- Shoukimas GM, Hinds JW. 1978. The development of the cerebral cortex in the embryonic mouse: an electron microscopic serial section analysis. *The Journal of comparative neurology* 179(4):795-830.
- Shtutman M, Zhurinsky J, Simcha I, Albanese C, D'Amico M, Pestell R, Ben-Ze'ev A. 1999. The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96(10):5522-5527.
- Shughrue PJ, Lane MV, Merchenthaler I. 1997. Comparative distribution of estrogen receptor- α and - β mRNA in the rat central nervous system. *The Journal of comparative neurology* 388(4):507-525.
- Sohrabji F, Miranda RC, Toran-Allerand CD. 1995. Identification of a putative estrogen response element in the gene encoding brain-derived neurotrophic factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92(24):11110-11114.
- Song H, Poo M. 2001. The cell biology of neuronal navigation. *Nature cell biology* 3(3):E81-88.
- Song RX, Barnes CJ, Zhang Z, Bao Y, Kumar R, Santen RJ. 2004. The role of Shc and insulin-like growth factor 1 receptor in mediating the translocation of estrogen receptor α to the plasma membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(7):2076-2081.
- Sperber BR, Leight S, Goedert M, Lee VM. 1995. Glycogen synthase kinase-3 β phosphorylates tau protein at multiple sites in intact cells. *Neuroscience letters* 197(2):149-153.
- Stauffer SR, Coletta CJ, Tedesco R, Nishiguchi G, Carlson K, Sun J, Katzenellenbogen BS, Katzenellenbogen JA. 2000. Pyrazole ligands: structure-affinity/activity relationships and estrogen receptor- α -selective agonists. *J Med Chem* 43(26):4934-4947.
- Stenoien DL, Patel K, Mancini MG, Dutertre M, Smith CL, O'Malley BW, Mancini MA. 2001. FRAP reveals that mobility of oestrogen receptor- α is ligand- and proteasome-dependent. *Nature cell biology* 3(1):15-23.
- Stirone C, Duckles SP, Krause DN, Procaccio V. 2005. Estrogen increases mitochondrial efficiency and reduces oxidative stress in cerebral blood vessels. *Molecular pharmacology* 68(4):959-965.
- Sutherland C, Leighton IA, Cohen P. 1993. Inactivation of glycogen synthase kinase-3 β by phosphorylation: new kinase connections in insulin and growth-factor signalling. *The Biochemical journal* 296 (Pt 1):15-19.
- Sun Y, Fang Y, Yoon MS, Zhang C, Roccio M, Zwartkruis FJ, Armstrong M, Brown HA, Chen J. 2008. Phospholipase D1 is an effector of Rheb in the mTOR pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105(24):8286-8291.
- Takahashi M, Tomizawa K, Kato R, Sato K, Uchida T, Fujita SC, Imahori K. 1994. Localization and developmental changes of tau protein kinase I/glycogen synthase kinase-3 β in rat brain. *Journal of neurochemistry* 63(1):245-255.
- Takei N, Inamura N, Kawamura M, Namba H, Hara K, Yonezawa K, Nawa H. 2004. Brain-derived neurotrophic factor induces mammalian target of rapamycin-dependent local activation of translation machinery and protein synthesis in neuronal dendrites. *J Neurosci* 24(44):9760-9769.
- Tee AR, Fingar DC, Manning BD, Kwiatkowski DJ, Cantley LC, Blenis J. 2002. Tuberous sclerosis complex-1 and -2 gene products function together to inhibit mammalian target of rapamycin (mTOR)-mediated downstream signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99(21):13571-13576.
- Tharakan R, Lepont P, Singleton D, Kumar R, Khan S. 2008. Phosphorylation of estrogen receptor α , serine residue 305 enhances activity. *Molecular and cellular endocrinology* 295(1-2):70-78.

- Thomas P, Pang Y, Filardo EJ, Dong J. 2005. Identity of an estrogen membrane receptor coupled to a G protein in human breast cancer cells. *Endocrinology* 146(2):624-632.
- Thornton TM, Pedraza-Alva G, Deng B, Wood CD, Aronshtam A, Clements JL, Sabio G, Davis RJ, Matthews DE, Doble B, Rincon M. 2008. Phosphorylation by p38 MAPK as an alternative pathway for GSK3 β inactivation. *Science (New York, NY)* 320(5876):667-670.
- Tian Q, Feetham MC, Tao WA, He XC, Li L, Aebersold R, Hood L. 2004. Proteomic analysis identifies that 14-3-3 ζ interacts with beta-catenin and facilitates its activation by Akt. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(43):15370-15375.
- Topalli I, Etgen AM. 2004. Insulin-like growth factor-I receptor and estrogen receptor crosstalk mediates hormone-induced neurite outgrowth in PC12 cells. *Brain research* 1030(1):116-124.
- Toran-Allerand CD. 2005. Estrogen and the brain: beyond ER- α , ER- β , and 17 β -estradiol. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1052:136-144.
- Toran-Allerand CD, Guan X, MacLusky NJ, Horvath TL, Diano S, Singh M, Connolly ES, Jr., Nethrapalli IS, Tinnikov AA. 2002. ER-X: a novel, plasma membrane-associated, putative estrogen receptor that is regulated during development and after ischemic brain injury. *J Neurosci* 22(19):8391-8401.
- Travis A, Amsterdam A, Belanger C, Grosschedl R. 1991. LEF-1, a gene encoding a lymphoid-specific protein with an HMG domain, regulates T-cell receptor alpha enhancer function [corrected]. *Genes & development* 5(5):880-894.
- Trejo JL, Carro E, Garcia-Galloway E, Torres-Aleman I. 2004. Role of insulin-like growth factor I signaling in neurodegenerative diseases. *J Mol Med* 82(3):156-162.
- Uchida, Y., Ohshima, T., Sasaki, Y., Suzuki, H., Yanai, S., Yamashita, N., Nakamura, F., Takei, K., Ihara, Y., Mikoshiba, K., Kolattukudy, P., Honnorat, J. & Goshima, Y. (2005). *Genes Cells*, **10**, 165-79.
- Valentine JE, Kalkhoven E, White R, Hoare S, Parker MG. 2000. Mutations in the estrogen receptor ligand binding domain discriminate between hormone-dependent transactivation and transrepression. *The Journal of biological chemistry* 275(33):25322-25329. Varmus FCAH. 2004 Nuclear-cytoplasmic shuttling of Axin regulates subcellular localization of β -catenin. *PNAS* vol. 101(9):2882-2887.
- Vegeto E, Belcredito S, Etteri S, Ghisletti S, Brusadelli A, Meda C, Krust A, Dupont S, Ciana P, Chambon P, Maggi A. 2003. Estrogen receptor- α mediates the brain antiinflammatory activity of estradiol. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(16):9614-9619.
- Veliskova J, Velisek L, Galanopoulou AS, Sperber EF. 2000. Neuroprotective effects of estrogens on hippocampal cells in adult female rats after status epilepticus. *Epilepsia* 41 Suppl 6:S30-35.
- Votin V, Nelson WJ, Barth AI. 2005. Neurite outgrowth involves adenomatous polyposis coli protein and beta-catenin. *Journal of cell science* 118(Pt 24):5699-5708.
- Wang C, Fu M, Angeletti RH, Siconolfi-Baez L, Reutens AT, Albanese C, Lisanti MP, Katzenellenbogen BS, Kato S, Hopp T, Fuqua SA, Lopez GN, Kushner PJ, Pestell RG. 2001. Direct acetylation of the estrogen receptor alpha hinge region by p300 regulates transactivation and hormone sensitivity. *The Journal of biological chemistry* 276(21):18375-18383.
- Wang H, Zeng X, Khan SA. 1999. Estrogen receptor variants ER δ 5 and ER δ 7 down-regulate wild-type estrogen receptor activity. *Molecular and cellular endocrinology* 156(1-2):159-168.
- Wang L, Andersson S, Warner M, Gustafsson JA. 2003a. Estrogen receptor (ER) β knockout mice reveal a role for ER β in migration of cortical neurons in the developing brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(2):703-708.
- Wang Z, Vogelstein B, Kinzler KW. 2003b. Phosphorylation of beta-catenin at S33, S37, or T41 can occur in the absence of phosphorylation at T45 in colon cancer cells. *Cancer research* 63(17):5234-5235.
- Wang Z, Zhang X, Shen P, Loggie BW, Chang Y, Deuel TF. 2005. Identification, cloning, and expression of human estrogen receptor- α 36, a novel variant of human estrogen receptor- α 66. *Biochemical and biophysical research communications* 336(4):1023-1027.
- Wang Z, Zhang X, Shen P, Loggie BW, Chang Y, Deuel TF. 2006. A variant of estrogen receptor- α , hER- α 36: transduction of estrogen- and antiestrogen-dependent membrane-initiated mitogenic signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(24):9063-9068.
- Watanabe T, Noritake J, Kakeno M, Matsui T, Harada T, Wang S, Itoh N, Sato K, Matsuzawa K, Iwamatsu A, Galjart N, Kaibuchi K. 2009. Phosphorylation of CLASP2 by GSK-3 β regulates its interaction with IQGAP1, EB1 and microtubules. *Journal of cell science* 122(Pt 16):2969-2979.

- Waterman ML, Fischer WH, Jones KA. 1991. A thymus-specific member of the HMG protein family regulates the human T cell receptor C alpha enhancer. *Genes & development* 5(4):656-669.
- Watters JJ, Campbell JS, Cunningham MJ, Krebs EG, Dorsa DM. 1997. Rapid membrane effects of steroids in neuroblastoma cells: effects of estrogen on mitogen activated protein kinase signalling cascade and c-fos immediate early gene transcription. *Endocrinology* 138(9):4030-4033.
- Weigel RJ, deConinck EC. 1993. Transcriptional control of estrogen receptor in estrogen receptor-negative breast carcinoma. *Cancer research* 53(15):3472-3474.
- White R, Lees JA, Needham M, Ham J, Parker M. 1987. Structural organization and expression of the mouse estrogen receptor. *Molecular endocrinology* (Baltimore, Md 1(10):735-744.
- Wiggin GR, Fawcett JP, Pawson T. 2005. Polarity proteins in axon specification and synaptogenesis. *Developmental cell* 8(6):803-816.
- Wijayaratne AL, McDonnell DP. 2001. The human estrogen receptor-alpha is a ubiquitinated protein whose stability is affected differentially by agonists, antagonists, and selective estrogen receptor modulators. *The Journal of biological chemistry* 276(38):35684-35692.
- Wise PM, Dubal DB. 2000. Estradiol protects against ischemic brain injury in middle-aged rats. *Biology of reproduction* 63(4):982-985.
- Wodarz A, Nusse R. 1998. Mechanisms of Wnt signaling in development. *Annual review of cell and developmental biology* 14:59-88.
- Wolf OT, Heinrich AB, Hanstein B, Kirschbaum C. 2005. Estradiol or estradiol/progesterone treatment in older women: no strong effects on cognition. *Neurobiology of aging* 26(7):1029-1033.
- Woodgett JR. 1990. Molecular cloning and expression of glycogen synthase kinase-3/factor A. *The EMBO journal* 9(8):2431-2438.
- Woolley CS, McEwen BS. 1992. Estradiol mediates fluctuation in hippocampal synapse density during the estrous cycle in the adult rat. *J Neurosci* 12(7):2549-2554.
- Woolley CS, McEwen BS. 1993. Roles of estradiol and progesterone in regulation of hippocampal dendritic spine density during the estrous cycle in the rat. *The Journal of comparative neurology* 336(2):293-306.
- Wu X, Tu X, Joeng KS, Hilton MJ, Williams DA, Long F. 2008. Rac1 activation controls nuclear localization of beta-catenin during canonical Wnt signaling. *Cell* 133(2):340-353.
- Xu H, Gouras GK, Greenfield JP, Vincent B, Naslund J, Mazzarelli L, Fried G, Jovanovic JN, Seeger M, Relkin NR, Liao F, Checler F, Buxbaum JD, Chait BT, Thinakaran G, Sisodia SS, Wang R, Greengard P, Gandy S. 1998. Estrogen reduces neuronal generation of Alzheimer beta-amyloid peptides. *Nature medicine* 4(4):447-451.
- Yaffe K, Sawaya G, Lieberburg I, Grady D. 1998. Estrogen therapy in postmenopausal women: effects on cognitive function and dementia. *Jama* 279(9):688-695.
- Yague JG, Munoz A, de Monasterio-Schrader P, Defelipe J, Garcia-Segura LM, Azcoitia I. 2006. Aromatase expression in the human temporal cortex. *Neuroscience* 138(2):389-401.
- Yamanaka T, Horikoshi Y, Suzuki A, Sugiyama Y, Kitamura K, Maniwa R, Nagai Y, Yamashita A, Hirose T, Ishikawa H, Ohno S. 2001. PAR-6 regulates aPKC activity in a novel way and mediates cell-cell contact-induced formation of the epithelial junctional complex. *Genes Cells* 6(8):721-731.
- Yamanaka H, Hashimoto N, Koyama K, Nakagawa H, Nakamura Y, Noguchi K. 2002. Expression of Apc2 during mouse development. *Brain Res Gene Expr Patterns* 1(2):107-114.
- Yan D, Wiesmann M, Rohan M, Chan V, Jefferson AB, Guo L, Sakamoto D, Caothien RH, Fuller JH, Reinhard C, Garcia PD, Randazzo FM, Escobedo J, Fantl WJ, Williams LT. 2001. Elevated expression of axin2 and hnk4 mRNA provides evidence that Wnt/beta -catenin signaling is activated in human colon tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98(26):14973-14978.
- Yang-Snyder J, Miller JR, Brown JD, Lai CJ, Moon RT. 1996. A frizzled homolog functions in a vertebrate Wnt signaling pathway. *Curr Biol* 6(10):1302-1306.
- Yang SH, Liu R, Perez EJ, Wen Y, Stevens SM, Jr., Valencia T, Brun-Zinkernagel AM, Prokai L, Will Y, Dykens J, Koulen P, Simpkins JW. 2004. Mitochondrial localization of estrogen receptor beta. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(12):4130-4135.
- Yoon MS, Cho CH, Lee KS, Han JS. 2006. Binding of Cdc42 to phospholipase D1 is important in neurite outgrowth of neural stem cells. *Biochemical and biophysical research communications* 347(3):594-600.

- Yoon MS, Yon C, Park SY, Oh DY, Han AH, Kim DS, Han JS. 2005. Role of phospholipase D1 in neurite outgrowth of neural stem cells. *Biochemical and biophysical research communications* 329(3):804-811.
- Yoshimura T, Arimura N, Kawano Y, Kawabata S, Wang S, Kaibuchi K. 2006. Ras regulates neuronal polarity via the PI3-kinase/Akt/GSK-3 β /CRMP-2 pathway. *Biochemical and biophysical research communications* 340(1):62-68.
- Yu X, Malenka RC. 2004. Multiple functions for the cadherin/catenin complex during neuronal development. *Neuropharmacology* 47(5):779-786.
- Zhang H, Macara IG. 2008. The PAR-6 polarity protein regulates dendritic spine morphogenesis through p190 RhoGAP and the Rho GTPase. *Developmental cell* 14(2):216-226.
- Zhang L, Rubinow DR, Xiang G, Li BS, Chang YH, Maric D, Barker JL, Ma W. 2001. Estrogen protects against beta-amyloid-induced neurotoxicity in rat hippocampal neurons by activation of Akt. *Neuroreport* 12(9):1919-1923.
- Zhang ZF, Fan SH, Lu J, Wu DM, Shan Q, Hu B, Li F, Zheng YL. 2008. [Cloning of gene fragment of estrogen receptor-beta and its expression in mouse embryo]. *Yi chuan = Hereditas / Zhongguo yi chuan xue hui bian ji* 30(3):347-351.

ANEXOS

TABLA ANEXA.

Resultados del análisis de los Microarrays en las dos poblaciones de células N2a: cDNA3.1 y Δ 56LEF-1/N2a.

Esta tabla muestra una selección mayor de genes que se encuentran sobre-activados (marcados en rojo) o disminuidos (marcados en verde) tras la adición de estradiol y de manera sensible al mutante de LEF-1. La lista que se presenta contiene solamente los genes que muestran una variación de su valor expresado en log2R mayor o menor a 1.

A las células N2a control (cDNA3.1/N2a) se les denominó grupo **A** de células, y grupo **B** a las células Δ 56LEF/N2a. En la tabla viene expresada la relación entre los dos bloques de células [**est** corresponde a la abreviación de estradiol, y **Wnt** al tratamiento con Wnt3a].

Se destacan dos genes (el correspondiente a plasminógeno, en amarillo, y el que codifica LEF-1, en azul) regulados por estradiol o por Wnt3a que fueron también validados a nivel de proteína.

SOBRE-ACIVADOS POR ESTRADIOL:

RefSeq_NM	est_A vs B	Nombre del gen:
		Finkel-Biskis-Reilly murine sarcoma virus (FBR-MuSV) ubiquitously
NM_007990.1	2,739	expressed (fox derived)
NM_133198.1	2,676	liver glycogen phosphorylase
NM_130888.1	2,457	nuclear RNA export factor 7
NM_025703.2	2,439	RIKEN cDNA 3930402F23 gene
NM_183271.1	2,181	RIKEN cDNA 1700049M11 gene
NM_008877.2	2,039	plasminogen
NM_007407.2	2,034	adenylate cyclase activating polypeptide 1 receptor 1
D87975.1	1,994	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade F, member 1
NM_019703.2	1,890	phosphofructokinase, platelet
NM_010480.4	1,847	heat shock protein 1, alpha
NM_054095.1	1,846	EF hand calcium binding protein 2
NM_013779.1	1,701	melanoma antigen, family L, 2
NM_021389.3	1,653	SH3-domain kinase binding protein 1
NM_009529.1	1,509	Xlr-related, meiosis regulated
NM_133362.1	1,491	erythroid differentiation regulator 1
NM_183294.1	1,487	cyclin-dependent kinase-like 1 (CDC2-related kinase)
NM_007833.1	1,462	decorin

BC053970.1	1,337	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1, alpha/beta subcomplex, 1
NM_008144.3	1,335	Bernardinelli-Seip congenital lipodystrophy 2 homolog (human)
NM_033325.1	1,332	lysyl oxidase-like 2
NM_175027.2	1,321	cDNA sequence BC022692
NM_146034.1	1,316	meningioma expressed antigen 6 (coiled-coil proline-rich)
NM_177752.2	1,313	hypothetical protein 6820428D13
NM_025437.2	1,298	eukaryotic translation initiation factor 1A, Y-linked
NM_019768.2	1,291	mortality factor 4 like 2
NM_008590.1	1,251	mesoderm specific transcript
NM_019647.3	1,247	ribosomal protein L21
NM_031174.2	1,246	Down syndrome cell adhesion molecule
NM_009093.1	1,237	ribosomal protein S29
NM_008200.1	1,225	histocompatibility 2, D region locus 4
NM_008033.2	1,222	farnesyltransferase, CAAX box, alpha
NM_026712.1	1,216	RIKEN cDNA 0610030H11 gene
NM_183203.1	1,202	hypothetical protein 9130430E04
NM_145628.2	1,200	ubiquitin specific protease 11
NM_207204.1	1,188	RIKEN cDNA 4930519N13 gene
NM_025695.2	1,178	SMC6 structural maintenance of chromosomes 6-like 1 (yeast)
NM_008183.2	1,177	glutathione S-transferase, mu 2
NM_145526.1	1,173	purinergic receptor P2X, ligand-gated ion channel, 3
NM_012035.1	1,136	transient receptor potential cation channel, subfamily C, member 7
NM_010206.1	1,135	fibroblast growth factor receptor 1
NM_146035.1	1,122	mannoside acetylglucosaminyltransferase 2
NM_175930.2	1,118	Rap guanine nucleotide exchange factor (GEF) 5
NM_013819.1	1,111	histocompatibility 2, M region locus 3
NM_008666.1	1,094	myelin transcription factor 1-like
NM_029823.1	1,092	RIKEN cDNA 6530401D17 gene
NM_172758.1	1,090	cDNA sequence BC031853
AK040457.1	1,085	interleukin 27 receptor, alpha
NM_194355.1	1,079	spire homolog 1 (Drosophila)
NM_007881.4	1,072	dentatorubral pallidoluysian atrophy
NM_025522.1	1,064	dehydrogenase/reductase (SDR family) member 7
NM_008549.1	1,063	mannosidase 2, alpha 1
NM_010545.2	1,058	Ia-associated invariant chain
NM_008810.2	1,058	pyruvate dehydrogenase E1 alpha 1

NM_175007.1	1,044	amphiphysin
NM_028270.2	1,029	aldehyde dehydrogenase 1 family, member B1
NM_008737.1	1,024	neuropilin
NM_008666.1	1,023	myelin transcription factor 1-like
NM_025932.1	1,016	synapse associated protein 1
NM_010195.1	1,006	G protein-coupled receptor 49

DISMINUÍDOS POR ESTRADIOL:

RefSeq_NM	est_AvsB	Nombre del gen:
NM_019932.1	-3,893	chemokine (C-X-C motif) ligand 4
NM_010703.2	-2,642	lymphoid enhancer binding factor 1
NM_013492.1	-2,293	clusterin
NM_011702.1	-2,053	vasoactive intestinal polypeptide
NM_010685.2	-1,992	lysosomal membrane glycoprotein 2
NM_011333.1	-1,986	chemokine (C-C motif) ligand 2
NM_010658.2	-1,809	v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene family, protein B (avian)
NM_010515.1	-1,705	insulin-like growth factor 2 receptor
AK033214.1	-1,677	G elongation factor
BC053489.1	-1,557	insulin-like growth factor 2
NM_023422.1	-1,438	histone 1, H2bc
AK027922.1	-1,427	glutathione S-transferase omega 1
NM_177708.3	-1,420	reticulon 4 receptor-like 1
NM_175395.2	-1,418	RIKEN cDNA 1700001A24 gene;RIKEN cDNA 6330578E17 gene
NM_053273.1	-1,410	tweety homolog 2 (Drosophila)
NM_009344.1	-1,395	pleckstrin homology-like domain, family A, member 1
NM_011844.3	-1,349	monoglyceride lipase
NM_009776.1	-1,346	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade G, member 1
NM_021274.1	-1,339	chemokine (C-X-C motif) ligand 10
NM_021897.1	-1,337	transformation related protein 53 inducible nuclear protein 1
NM_138683.1	-1,303	thrombospondin type 1 domain containing gene
NM_010789.1	-1,292	myeloid ecotropic viral integration site 1
NM_016867.1	-1,291	semaF cytoplasmic domain associated protein 2
BC058269.1	-1,290	RAR-related orphan receptor beta
NM_007635.2	-1,279	cyclin G2
NM_015818.1	-1,275	heparan sulfate 6-O-sulfotransferase 1

NM_026416.2	-1,261	S100 calcium binding protein A16
NM_145825.1	-1,260	centrin 4
AK035160.1	-1,252	heart and neural crest derivatives expressed transcript 2
NM_028535.1	-1,251	RIKEN cDNA 1700049E17 gene
AK031672.1	-1,246	DNA segment, Chr 11, ERATO Doi 498, expressed
NM_178405.2	-1,233	ATPase, Na ⁺ /K ⁺ transporting, alpha 2 polypeptide
NM_172854.1	-1,213	RIKEN cDNA 4932431K08 gene
NM_009242.1	-1,180	secreted acidic cysteine rich glycoprotein
NM_021537.2	-1,172	serine/threonine kinase 25 (yeast)
NM_008250.1	-1,167	H2.0-like homeo box gene
NM_008538.2	-1,167	myristoylated alanine rich protein kinase C substrate
NM_026793.1	-1,166	myc target 1
NM_011353.1	-1,163	small EDRK-rich factor 1
NM_026358.1	-1,160	RIKEN cDNA 4930583H14 gene
NM_009726.2	-1,158	ATPase, Cu ⁺⁺ transporting, alpha polypeptide
NM_194268.2	-1,155	one cut domain, family member 2
NM_011295.2	-1,142	ribosomal protein S12
NM_175103.2	-1,135	RIKEN cDNA 1110025L05 gene
NM_025836.1	-1,130	mannose-6-phosphate receptor binding protein 1
NM_025692.1	-1,127	ubiquitin-activating enzyme E1-domain containing 1
NM_025394.1	-1,126	translocase of outer mitochondrial membrane 7 homolog (yeast)
NM_028279.1	-1,125	N-acetylated alpha-linked acidic dipeptidase 2
NM_133780.2	-1,125	translocated promoter region sema domain, immunoglobulin domain (Ig), transmembrane domain (TM)
NM_013660.1	-1,120	and short cytoplasmic domain, (semaphorin) 4D
NM_013692.1	-1,120	TGFB inducible early growth response 1
NM_010357.1	-1,119	glutathione S-transferase, alpha 4
NM_018865.1	-1,108	WNT1 inducible signaling pathway protein 1
NM_010317.2	-1,107	guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 4 subunit
NM_173788.2	-1,101	natriuretic peptide receptor 2
NM_175238.4	-1,089	DNA segment, Chr 2, ERATO Doi 145, expressed
NM_011313.1	-1,088	S100 calcium binding protein A6 (calcyclin)
NM_025735.1	-1,080	microtubule-associated protein 1 light chain 3 alpha
NM_178751.2	-1,080	RIKEN cDNA A730041O15 gene
NM_030037.1	-1,078	motile sperm domain containing 3
NM_017367.2	-1,078	cyclin I

NM_133218.1	-1,077	glucocorticoid induced gene 1
AK010069.1	-1,075	DNA segment, Chr 7, Wayne State University 87, expressed
NM_026033.1	-1,074	ocular development associated gene
NM_021398.1	-1,070	solute carrier family 43, member 3
NM_174988.2	-1,063	cadherin 22
NM_026111.2	-1,043	RIKEN cDNA 1810019P04 gene
NM_012057.1	-1,042	interferon regulatory factor 5
AK076923.1	-1,042	protein phosphatase 1B, magnesium dependent, beta isoform
NM_133859.1	-1,040	olfactomedin-like 3
NM_026565.2	-1,038	RIKEN cDNA 9430083G14 gene
NM_133942.1	-1,037	expressed sequence AA960558
AK003039.1	-1,030	glycolipid transfer protein
NM_008967.1	-1,022	prostaglandin I receptor (IP)
NM_023649.1	-1,020	Usher syndrome 1C homolog (human)
NM_025946.2	-1,013	RIKEN cDNA 2010100O12 gene
NM_009113.2	-1,010	S100 calcium binding protein A13
NM_027285.1	-1,009	RIKEN cDNA 1700029I01 gene
NM_172296.1	-1,009	doublesex and mab-3 related transcription factor like family A2
NM_009814.1	-1,007	calsequestrin 2
NM_013765.1	-1,005	ribosomal protein S26
NM_011952.1	-1,003	mitogen activated protein kinase 3
NM_010831.1	-1,001	SNF1-like kinase

SOBRE-ACTIVDOS POR WNT3a:

RefSeq_NM	Wnt_AvsB	Gene_Symbol	Nombre del gen:
			Finkel-Biskis-Reilly murine sarcoma virus (FBR-MuSV)
NM_007990.1	3,603	Fau	ubiquitously expressed (fox derived)
NM_133198.1	2,620	Pygl	liver glycogen phosphorylase
NM_019703.2	2,343	Pfkb	phosphofructokinase, platelet
NM_007407.2	2,294	Adcyap1r1	adenylate cyclase activating polypeptide 1 receptor 1
NM_025703.2	2,270	3930402F23Rik	RIKEN cDNA 3930402F23 gene
NM_183271.1	2,215	1700049M11Rik	RIKEN cDNA 1700049M11 gene
			NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1,
BC053970.1	2,198	Ndufab1	alpha/beta subcomplex, 1
NM_130888.1	2,106	Nxf7	nuclear RNA export factor 7
			serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade F,
D87975.1	2,052	Serpinf1	member 1
NM_021389.3	1,966	Sh3kbp1	SH3-domain kinase binding protein 1
NM_054095.1	1,910	Efcfbp2	EF hand calcium binding protein 2
NM_133362.1	1,797	Erdr1	erythroid differentiation regulator 1
NM_177752.2	1,682	6820428D13	hypothetical protein 6820428D13
NM_172960.1	1,608	Adck5	aarF domain containing kinase 5
AK040457.1	1,501	Il27ra	interleukin 27 receptor, alpha
NM_008595.1	1,446	Mfng	manic fringe homolog (Drosophila)
NM_033325.1	1,445	Loxl2	lysyl oxidase-like 2
NM_145526.1	1,425	P2rx3	purinergic receptor P2X, ligand-gated ion channel, 3
NM_008183.2	1,419	Gstm2	glutathione S-transferase, mu 2
			SMC6 structural maintenance of chromosomes 6-like 1
NM_025695.2	1,414	Smc6l1	(yeast)
NM_009369.1	1,414	Tgfbi	transforming growth factor, beta induced
NM_025522.1	1,410	Dhrs7	dehydrogenase/reductase (SDR family) member 7
NM_007997.1	1,399	Fdxr	ferredoxin reductase
NM_207204.1	1,382	4930519N13Rik	RIKEN cDNA 4930519N13 gene
NM_007833.1	1,360	Dcn	decorin
NM_008877.2	1,342	Plg	plasminogen
NM_019966.1	1,331	Mlycd	malonyl-CoA decarboxylase
NM_175027.2	1,316	BC022692	cDNA sequence BC022692
NM_080553.1	1,309	Itpr3	inositol 1,4,5-triphosphate receptor 3

NM_010480.4	1,308	Hspca	heat shock protein 1, alpha
NM_029823.1	1,273	6530401D17Rik	RIKEN cDNA 6530401D17 gene
			Bernardinelli-Seip congenital lipodystrophy 2
NM_008144.3	1,273	Bscl2	homolog (human)
NM_198031.1	1,266	Tubgcp3	tubulin, gamma complex associated protein 3
NM_008810.2	1,249	Pdha1	pyruvate dehydrogenase E1 alpha 1
NM_008666.1	1,246	Myt1l	myelin transcription factor 1-like
NM_173427.1	1,240	B230308G19Rik	RIKEN cDNA B230308G19 gene
			U2 small nuclear ribonucleoprotein auxiliary factor
NM_178794.2	1,234	U2af1-rs2	(U2AF) 1, related sequence 2
NM_146034.1	1,234	Mgea6	meningioma expressed antigen 6 (coiled-coil proline-rich)
			ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member
NM_019552.1	1,229	Abcb10	10
NM_178915.2	1,221	AI839735	expressed sequence AI839735
NM_008243.2	1,215	Mst1	macrophage stimulating 1 (hepatocyte growth factor-like)
NM_145482.1	1,175	ORF21	open reading frame 21
NM_025936.1	1,173	Rars	arginyl-tRNA synthetase
NM_028262.1	1,168	D12ErtD771e	DNA segment, Chr 12, ERATO Doi 771, expressed
NM_031174.2	1,164	Dscam	Down syndrome cell adhesion molecule
NM_023304.1	1,149	Fgf22	fibroblast growth factor 22
NM_025932.1	1,139	Syap1	synapse associated protein 1
			aldo-keto reductase family 1, member C13;aldo-keto r
NM_013778.1	1,130	Akr1c13;Akr1c12	eductase family 1, member C12
NM_013819.1	1,129	H2-M3	histocompatibility 2, M region locus 3
NM_007407.2	1,126	Adcyap1r1	adenylate cyclase activating polypeptide 1 receptor 1
NM_021273.2	1,122	Ckb	creatine kinase, brain
NM_008033.2	1,119	Fnta	farnesyltransferase, CAAX box, alpha
NM_009529.1	1,115	Xmr	Xlr-related, meiosis regulated
NM_207269.1	1,111	D330050I23Rik	RIKEN cDNA D330050I23 gene
NM_010752.1	1,108	Mad1l1	mitotic arrest deficient 1-like 1
NM_028089.1	1,091	Cyp2c55	cytochrome P450, family 2, subfamily c, polypeptide 55
NM_133224.1	1,090	Atp13a	ATPase type 13A
NM_025656.1	1,089	Sip1	survivor of motor neuron protein interacting protein 1
NM_028002.1	1,088	2310069P03Rik	RIKEN cDNA 2310069P03 gene
NM_010724.1	1,086	Psmb8	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type 8
NM_028131.1	1,081	2610510J17Rik	RIKEN cDNA 2610510J17 gene

NM_009239.1	1,080	Sp4	trans-acting transcription factor 4
NM_025437.2	1,077	Eif1ay	eukaryotic translation initiation factor 1A, Y-linked
NM_183294.1	1,072	Cdk11	cyclin-dependent kinase-like 1 (CDC2-related kinase)
NM_013779.1	1,070	Magel2	melanoma antigen, family L, 2
NM_021556.2	1,063	Mrps30	mitochondrial ribosomal protein S30
			dual-specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation
NM_207210.1	1,059	Dyrk4	regulated kinase 4
NM_146035.1	1,057	Mgat2	mannoside acetylglucosaminyltransferase 2
NM_144844.1	1,049	Pcca	propionyl-Coenzyme A carboxylase, alpha polypeptide
NM_178389.2	1,045	Gale	galactose-4-epimerase, UDP
			transient receptor potential cation channel, subfamily C,
NM_012035.1	1,041	Trpc7	member 7
NM_176953.2	1,034	Lig4	ligase IV, DNA, ATP-dependent
NM_008183.2	1,033	Gstm2	glutathione S-transferase, mu 2
NM_178242.2	1,032	Zfp469	zinc finger protein 469
NM_009933.1	1,030	Col6a1	procollagen, type VI, alpha 1
NM_010068.1	1,030	Dnmt3b	DNA methyltransferase 3B
NM_028270.2	1,027	Aldh1b1	aldehyde dehydrogenase 1 family, member B1
NM_172783.1	1,022	Phka2	phosphorylase kinase alpha 2
NM_008590.1	1,020	Mest	mesoderm specific transcript
NM_013761.2	1,017	Srr	serine racemase
NM_029541.1	1,017	6530401D17Rik	RIKEN cDNA 6530401D17 gene
NM_025486.1	1,012	1700006C06Rik	RIKEN cDNA 1700006C06 gene
NM_130864.2	1,012	Acaa1	acetyl-Coenzyme A acyltransferase 1

DISMINUÍDOS POR WNT3a:

RefSeq_NM	Wnt_AvsB	Gene_Symbol	Nombre del gen:
NM_019932.1	-3,616	Cxcl4	chemokine (C-X-C motif) ligand 4
NM_010703.2	-3,395	Lef1	lymphoid enhancer binding factor 1
NM_011702.1	-2,102	Vip	vasoactive intestinal polypeptide
NM_010685.2	-2,085	Lamp2	lysosomal membrane glycoprotein 2
NM_011333.1	-1,843	Ccl2	chemokine (C-C motif) ligand 2
AK027922.1	-1,770	Gsto1	glutathione S-transferase omega 1
NM_010515.1	-1,748	Igf2r	insulin-like growth factor 2 receptor
NM_007635.2	-1,679	Ccng2	cyclin G2
NM_013492.1	-1,634	Clu	clusterin
NM_027285.1	-1,585	1700029I01Rik	RIKEN cDNA 1700029I01 gene
NM_177708.3	-1,583	Rtn4rl1	
NM_016867.1	-1,571	Semcap2	semaF cytoplasmic domain associated protein 2
NM_009150.2	-1,552	Selenbp2;Selenbp1	selenium binding protein 2;selenium binding protein 1
NM_177820.2	-1,484	9130218O11Rik	RIKEN cDNA 9130218O11 gene
NM_009726.2	-1,423	Atp7a	ATPase, Cu ⁺⁺ transporting, alpha polypeptide
NM_026416.2	-1,393	S100a16	S100 calcium binding protein A16
NM_023422.1	-1,390	Hist1h2bc	histone 1, H2bc
			BCL2/adenovirus E1B 19kDa-interacting protein 1, NIP3
NM_009760.2	-1,378	Bnip3	
NM_030037.1	-1,334	Mospd3	motile sperm domain containing 3
NM_010149.2	-1,323	Epor	erythropoietin receptor
			doublesex and mab-3 related transcription factor like family A2
NM_172296.1	-1,305	Dmrta2	
			protein phosphatase 1B, magnesium dependent, beta isoform
AK076923.1	-1,305	Ppm1b	
NM_026030.1	-1,298	Eif2s2	eukaryotic translation initiation factor 2, subunit 2 (beta)
NM_194268.2	-1,294	Onecut2	one cut domain, family member 2
NM_008926.2	-1,293	Prkg2	protein kinase, cGMP-dependent, type II
NM_026565.2	-1,291	9430083G14Rik	RIKEN cDNA 9430083G14 gene
NM_025949.1	-1,279	Rps6ka6	ribosomal protein S6 kinase polypeptide 6
NM_009242.1	-1,264	Sparc	secreted acidic cysteine rich glycoprotein
NM_178405.2	-1,256	Atp1a2	ATPase, Na ⁺ /K ⁺ transporting, alpha 2 polypeptide
NM_007874.2	-1,237	Dp1	deleted in polyposis 1

NM_026793.1	-1,236	Myct1	myc target 1
NM_177603.1	-1,228	Frat2	frequently rearranged in advanced T-cell lymphomas 2
NM_025836.1	-1,224	M6prbp1	mannose-6-phosphate receptor binding protein 1
NM_028535.1	-1,224	1700049E17Rik	RIKEN cDNA 1700049E17 gene
NM_026358.1	-1,221	4930583H14Rik	RIKEN cDNA 4930583H14 gene
NM_172132.1	-1,218	Jmjd2b	jumonji domain containing 2B
AK005820.1	-1,210	Rabl5	RAB, member of RAS oncogene family-like 5
AK049314.1	-1,193	Trim27	tripartite motif protein 27
NM_017367.2	-1,188	Ccni	cyclin I
NM_009814.1	-1,180	Casq2	calsequestrin 2
NM_009101.1	-1,174	Rras	Harvey rat sarcoma oncogene, subgroup R
AK003039.1	-1,174	Gltp	glycolipid transfer protein
NM_008467.2	-1,172	Kpna4	karyopherin (importin) alpha 4
BC038145.1	-1,172	BC002199	cDNA sequence BC002199
NM_133780.2	-1,168	Tpr	translocated promoter region
NM_177798.3	-1,157	Frs2	fibroblast growth factor receptor substrate 2
NM_008906.2	-1,153	Ppgb	protective protein for beta-galactosidase
NM_015818.1	-1,152	Hs6st1	heparan sulfate 6-O-sulfotransferase 1
NM_009113.2	-1,152	S100a13	S100 calcium binding protein A13
NM_009344.1	-1,148	Phlda1	pleckstrin homology-like domain, family A, member 1
NM_019675.2	-1,148	Stmn4	stathmin-like 4
NM_146141.1	-1,147	1110013G13Rik	RIKEN cDNA 1110013G13 gene
NM_009140.1	-1,146	Cxcl2	chemokine (C-X-C motif) ligand 2
NM_173788.2	-1,145	Npr2	natriuretic peptide receptor 2
NM_021274.1	-1,144	Cxcl10	chemokine (C-X-C motif) ligand 10
AK052456.1	-1,142	D430026P16Rik	RIKEN cDNA D430026P16 gene
NM_153399.1	-1,140	Syne1	synaptic nuclear envelope 1
NM_011756.3	-1,136	Zfp36	zinc finger protein 36
AK083556.1	-1,136	Fst	follistatin
NM_026033.1	-1,122	Odag	ocular development associated gene
NM_031997.2	-1,121	Tmem2	transmembrane protein 2
NM_178772.2	-1,117	B230106I24Rik	RIKEN cDNA B230106I24 gene
NM_011353.1	-1,112	Serf1	small EDRK-rich factor 1
NM_021398.1	-1,110	Slc43a3	solute carrier family 43, member 3
NM_027482.1	-1,095	5730508B09Rik	RIKEN cDNA 5730508B09 gene
NM_133777.1	-1,087	Ube2s	ubiquitin-conjugating enzyme E2S

NM_012057.1	-1,083	Irf5	interferon regulatory factor 5 sema domain, immunoglobulin domain (Ig), (semaphorin) 4D
NM_013660.1	-1,080	Sema4d	
NM_146260.1	-1,080	Tmie	transmembrane inner ear
NM_153068.1	-1,075	Ehd2	EH-domain containing 2
NM_138584.1	-1,074	Spg21	spastic paraplegia 21 homolog (human)
NM_011295.2	-1,073	Rps12	ribosomal protein S12 solute carrier family 16 (monocarboxylic acid transporters), member 3
NM_030696.2	-1,071	Slc16a3	
NM_130903.2	-1,068	Cd209c	CD209c antigen
NM_020586.1	-1,068	5031400M07Rik	RIKEN cDNA 5031400M07 gene
NM_031997.2	-1,067	Tmem2	transmembrane protein 2
NM_010789.1	-1,065	Meis1	myeloid ecotropic viral integration site 1
NM_011498.2	-1,065	Bhlhb2	basic helix-loop-helix domain containing, class B2
NM_025290.2	-1,063	Tsga2	testis specific gene A2 O-linked N-acetylglucosamine (GlcNAc) transferase (UDP-N-acetylglucosamine:polypeptide-N- acetylglucosaminyl transferase)
NM_139144.2	-1,063	Ogt	
NM_009895.2	-1,059	Cish	cytokine inducible SH2-containing protein
NM_011171.1	-1,057	Procr	protein C receptor, endothelial
NM_019880.2	-1,056	Mtch1	mitochondrial carrier homolog 1 (C. elegans) v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene family, protein B (avian)
NM_010658.2	-1,056	Mafb	
NM_011046.1	-1,054	Furin	furin (paired basic amino acid cleaving enzyme)
NM_011252.2	-1,053	RbmX	RNA binding motif protein, X chromosome
NM_007585.2	-1,047	Anxa2	annexin A2 NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 3
NM_025348.1	-1,045	Ndufa3	
BC028655.1	-1,044	Solt	SoxLZ/Sox6 leucine zipper binding protein in testis
NM_028279.1	-1,043	Naalad2	N-acetylated alpha-linked acidic dipeptidase 2
NM_018865.1	-1,040	Wisp1	WNT1 inducible signaling pathway protein 1
NM_178751.2	-1,038	A730041O15Rik	RIKEN cDNA A730041O15 gene
NM_029688.2	-1,037	Npn3	neoplastic progression 3
NM_013692.1	-1,031	Tieg1	TGFB inducible early growth response 1
NM_013525.1	-1,025	Gas5	growth arrest specific 5
NM_175395.2	-1,023	1700001A24Rik;	RIKEN cDNA 1700001A24 gene;RIKEN cDNA

		6330578E17Rik	6330578E17 gene
NM_019704.1	-1,023	C78915	expressed sequence C78915
NM_010234.2	-1,022	Fos	FBJ osteosarcoma oncogene
NM_011594.2	-1,020	Timp2	tissue inhibitor of metalloproteinase 2
			DNA segment, Chr 15, Wayne State University 169,
NM_198420.1	-1,019	D15Wsu169e	expressed
NM_008662.1	-1,018	Myo6	myosin VI
AK033214.1	-1,018	Gfm	G elongation factor
			NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha
NM_010885.2	-1,013	Ndufa2	subcomplex, 2
NM_027287.1	-1,007	Dnajb4	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 4
NM_133942.1	-1,006	AA960558	expressed sequence AA960558
NM_007664.1	-1,005	Cdh2	cadherin 2
NM_027189.1	-1,004	Gemin7	gem (nuclear organelle) associated protein 7
NM_009627.1	-1,001	Adm	adrenomedullin

Estradiol Activates β -Catenin Dependent Transcription in Neurons

Olga Varea¹, Juan Jose Garrido^{1,4}, Ana Dopazo², Pablo Mendez³, Luis Miguel Garcia-Segura³, Francisco Wandosell^{1*}

1 Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED) and Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”, CSIC-UAM, Madrid, Spain, **2** Genomics Unit, Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC), Madrid, Spain, **3** Laboratory of Neuroactive Steroids, Instituto Cajal, CSIC, Madrid, Spain, **4** Laboratory of Neuronal Polarity, Instituto Cajal, CSIC, Madrid, Spain

Abstract

Estradiol may fulfill a plethora of functions in neurons, in which much of its activity is associated with its capacity to directly bind and dimerize estrogen receptors. This hormone-protein complex can either bind directly to estrogen response elements (ERE's) in gene promoters, or it may act as a cofactor at non-ERE sites interacting with other DNA-binding elements such as AP-1 or c-Jun. Many of the neuroprotective effects described for estrogen have been associated with this mode of action. However, recent evidence suggests that in addition to these “genomic effects”, estrogen may also act as a more general “trophic factor” triggering cytoplasmic signals and extending the potential activity of this hormone. We demonstrated that estrogen receptor alpha associates with β -catenin and glycogen synthase kinase 3 in the brain and in neurons, which has since been confirmed by others. Here, we show that the action of estradiol activates β -catenin transcription in neuroblastoma cells and in primary cortical neurons. This activation is time and concentration-dependent, and it may be abolished by the estrogen receptor antagonist ICI 182780. The transcriptional activation of β -catenin is dependent on lymphoid enhancer binding factor-1 (LEF-1) and a truncated-mutant of LEF-1 almost completely blocks estradiol TCF-mediated transcription. Transcription of a TCF-reporter in a transgenic mouse model is enhanced by estradiol in a similar fashion to that produced by Wnt3a. In addition, activation of a luciferase reporter driven by the *engrailed* promoter with three LEF-1 repeats was mediated by estradiol. We established a cell line that constitutively expresses a dominant-negative LEF-1 and it was used in a gene expression microarray analysis. In this way, genes that respond to estradiol or Wnt3a, sensitive to LEF-1, could be identified and validated. Together, these data demonstrate the existence of a new signaling pathway controlled by estradiol in neurons. This pathway shares some elements of the insulin-like growth factor-1/Insulin and Wnt signaling pathways, however, our data strongly suggest that it is different from that of both these ligands. These findings may reveal a set of new physiological roles for estrogens, at least in the Central Nervous System (CNS).

Citation: Varea O, Garrido JJ, Dopazo A, Mendez P, Garcia-Segura LM, et al. (2009) Estradiol Activates β -Catenin Dependent Transcription in Neurons. PLoS ONE 4(4): e5153. doi:10.1371/journal.pone.0005153

Editor: Lin Mei, Medical College of Georgia, United States of America

Received: October 29, 2008; **Accepted:** February 17, 2009; **Published:** April 10, 2009

Copyright: © 2009 Varea et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by grants from CIBERNED (which was an initiative of the ISCIII), Plan Nacional DGICYT, SAF2006-12782-C03-01 and by an Institutional grant from the Fundación Areces. OV was supported by MEC fellowship and CIBERNED contract. PM was supported by MEC fellowship. The funders had no role in the study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: fwandosell@cbm.uam.es

Introduction

Estrogens fulfill a wide range of functions during development and differentiation in mammals of both sexes. In addition to these functions, they are also thought to play an important role in neuroprotection [1–3]. The actions of estrogens have been classified as either “genomic actions” or “non-genomic, rapid actions”. The genomic actions are based on the capacity of the estrogen receptors (ERs) to bind to co-activators or co-repressors in order to enhance or inhibit the transcription of target genes, and it has been reported in many cell types (reviewed in [4]). This activity involves the dimerization of two receptor molecules mediated by the presence of the hormone and the generation of a macromolecular complex with co-regulators (reviewed in [5]). The ERs belong to the nuclear receptor superfamily and two receptors, alpha and beta, have been identified (NR3A1 and NR3A2, according to the nomenclature of the NRN Committee [6]). The structure of both receptors is similar containing a highly

homologous DNA-binding region (95%) and a hormone binding region with weaker homology (69%), whereas the carboxy and amino-terminal regions are the most divergent regions (58% homology, reviewed in [7]). Apart from this genomic action, estrogen can trigger rapid “non-genomic signaling” associated with the activation of second messengers. Among these, the activation of the mitogen activated protein kinase (MAPK) [8], protein kinase C (PKC) [9] and phosphoinositide 3-kinase (PI3K) [10] signaling pathways has been described. Indeed, cooperation with insulin-like growth factor-1 (IGF-1) has been demonstrated and ER α has been reported to associate with p85, the regulatory subunit of PI3K [11–12]. Furthermore, estrogens may also act in a ligand-independent manner [13] and they may exert certain antioxidant effects that are independent of their receptors.

We recently demonstrated that ER α is linked to PI3K associated “cytoplasmic signaling” in the brain and in primary neurons, where estradiol can induce the immediate activation of Akt/PKB and the subsequent inhibition of glycogen synthase

kinase 3 (GSK3). On the light of the important role proposed for GSK3 in neuronal survival [14] and in neuropathologies such as amyloid neurotoxicity [15], the role of this new estradiol signaling pathway merits further analysis.

We also identified novel complexes in which ER α , GSK3 and β -catenin were associated, demonstrating that the action of estradiol transiently stabilized β -catenin, which is disassociated from the complex with ER α [12]. The stabilization of β -catenin has been related with different functions of this protein. In addition to act in cell-cell adhesion, β -catenin also serves as a co-transcriptional regulator, modulating the functions of the T cell factor (TCF)/ lymphoid enhancer binding factor (LEF) proteins that are closely associated with Wnt signaling (reviewed in [16–19]). Hence, the stabilization of β -catenin by estradiol may also have effects on gene transcription.

In this study we have assessed whether the β -catenin, stabilized by estradiol in neurons, may exert a significant effect at the transcriptional level. We show that the stabilization of β -catenin by estradiol is correlated with the inhibition of GSK3 in neuronal-like cells (N2a-m), as well as in cortical neurons. Indeed, estradiol increased TCF/LEF-1 transcription in a dose-dependent manner. This increase in transcription was partially prevented by the addition of an estradiol antagonist and was mimicked by an α and β specific-agonist. In neuronal cells, estradiol induced the formation of a TCF-DNA complex that was impaired by the presence of antibodies against LEF-1. Moreover, in cortical neurons from a TCF/LEF-1- β gal transgenic mouse, β -galactosidase activity was up-regulated by the action of estradiol. Finally, in a LEF-1 mutant cell line, we identified some genes that were differentially regulated by estradiol.

Together, all these data demonstrate that in addition to its nuclear action mediated through the ER, estradiol triggers a signal that recruits β -catenin and LEF-1 and that may be responsible for more wide-ranging actions of this hormone, at least in neurons.

Results

Estradiol transiently regulates the phosphorylation of GSK3 and the amount of β -catenin in N2a-m neuronal cells and cortical neurons

We recently demonstrated that estradiol inhibit GSK3 and stabilize β -catenin in the hippocampus and in hippocampal neurons. To further analyze this phenomenon, it was necessary to transfect neuronal cells. We first examined whether neuroblastoma cells behave like primary neurons concerning this estrogenic action. We found that **N2a-m** cells, a clone derived from NB2a (ATCC: CCL 131) and that has been maintained for several years in our laboratory, responded to estradiol in a similar manner as primary neurons, as demonstrated below.

The effect of estradiol on this cell line was examined and we initially determined whether N2a-m cells expressed both α and β estrogen receptors when maintained in serum-free medium (Supplementary Figure S1). When N2a-m cells were exposed to estradiol, ER α -immunoreactivity became more concentrated in the nucleus in a time and dose dependent manner (Supplementary Figure S1). Thus, since these cells respond to estradiol and can be efficiently transfected, we analyzed whether exposure to estradiol could modify GSK3 β -PSer using primary cortical neurons as a reference in parallel. Immunoreactivity against GSK3 β -PSer was increased in N2a-m cells exposed to estradiol, reaching a maximum (5 ± 1 fold, $n = 4$) 60–90 minutes after the addition of the hormone (Figure 1A). A similar time-course of GSK3 β -PSer immunoreactivity was observed in cortical primary neurons (Figure 1C), reaching a maximum increase (2.2 ± 0.5 fold; $n = 3$)

90 minutes after exposure to the hormone. The increase in serine phosphorylation of GSK3 β was dose-dependent and was maximal in the range of 100 to 200 nM (2.5 ± 0.5 fold; $n = 3$, Figure 1A).

The second important element in our analysis is β -catenin, as demonstrated in hippocampal neurons [12]. Thus, we determined whether inhibition of GSK3 was correlated with the stabilization of β -catenin in cell extracts from N2a-m and cortical neurons treated with estradiol (100 nM). The total amount of β -catenin increased in both N2a-m cells (3.5 ± 0.5 fold; $n = 3$) (Figure 1A) and cortical neurons (2.2 ± 0.3 folds, $n = 3$) (Figure 1C), with a time-course similar to that of the changes in GSK3-PSer (Figure 1 A and B). The increase in the stabilization of β -catenin by estradiol was prevented by ICI 182780, a specific ER receptor antagonist (*ICI/estradiol ratio was maintained 100×*) (Figure 1B).

A complex of ER α and β -catenin was recently detected in the hippocampus of female ovariectomized rats [12]. We assessed whether a similar complex was present in extracts from N2a-m cells. Our data showed that β -catenin was detected in complexes immunoprecipitated with antibodies against ER α or ER β (Figure 2). Similarly, both GSK3 α and β were detected in these complexes, although there was less GSK3 recovered when antibodies against ER α were used. As a positive control in these experiments, material was immunoprecipitated with an antibody against Adenomatous Polyposis Coli protein (APC) and in these latter experiments, mostly GSK3 β was detected (Figure 2).

Estradiol increase the association of β -catenin to the neuronal membrane fraction

Given that β -catenin may fulfill two distinct cellular functions, as an adhesion molecule or as co-transcription factor. Two different pools have been described associated with different functions [16,20]. Thus, we determined whether estradiol-mediated stabilization augmented either of the putative β -catenin pools. Membrane and nuclear fractions were obtained from cultured neurons exposed to the hormone for 30 and 60 minutes. Interestingly, the amount of β -catenin detected in the membrane fraction was increased at 30 and 60 minutes after exposure to estradiol whereas the nuclear fraction was almost unaffected (Supplementary Figure S2).

Estradiol activates TCF-mediated transcription

Even though accumulation of β -catenin in the cell nucleus could not be perceived at the biochemical level, we assessed whether estradiol might induce β -catenin mediated transcriptional activation. For this purpose we transfected N2a-m cells with a TCF-luciferase reporter (TOPFlash) in combination with an EGFP reporter. When estradiol (100 nM) was added after cell transfection, luciferase activity increased 24 ± 4 fold ($n = 4$, Figure 3D), reaching a maximum 60–90 minutes after hormonal exposure (Figure 3A). The estradiol-induced increase in luciferase activity was time and concentration-dependent (Figure 3A–B). Moreover, the transcriptional activity depended on ERs since it was drastically reduced when the ER antagonist ICI 182780 was applied in conjunction with estradiol (Figure 3C). In parallel, when we transfected N2a-m cells with a mutated form of the TCF reporter (FOPFlash) we were unable to detect *luciferase* activity (Figure 3C).

To determine whether this transcriptional activation was associated with ER α or ER β , we used two specific agonists of either the α or β receptor isoforms. Both 4,4',4''-(propyl-[(1H)-pyrazole-1,3,5-triyl] trisphenol (PPT, α -selective) and 2,3-bis (4-hydroxyphenyl) propionitrile (DPN (β -selective) agonists increased transcriptional activity in N2a-m cells, although the activity mediated by PPT was more prominent than that mediated by

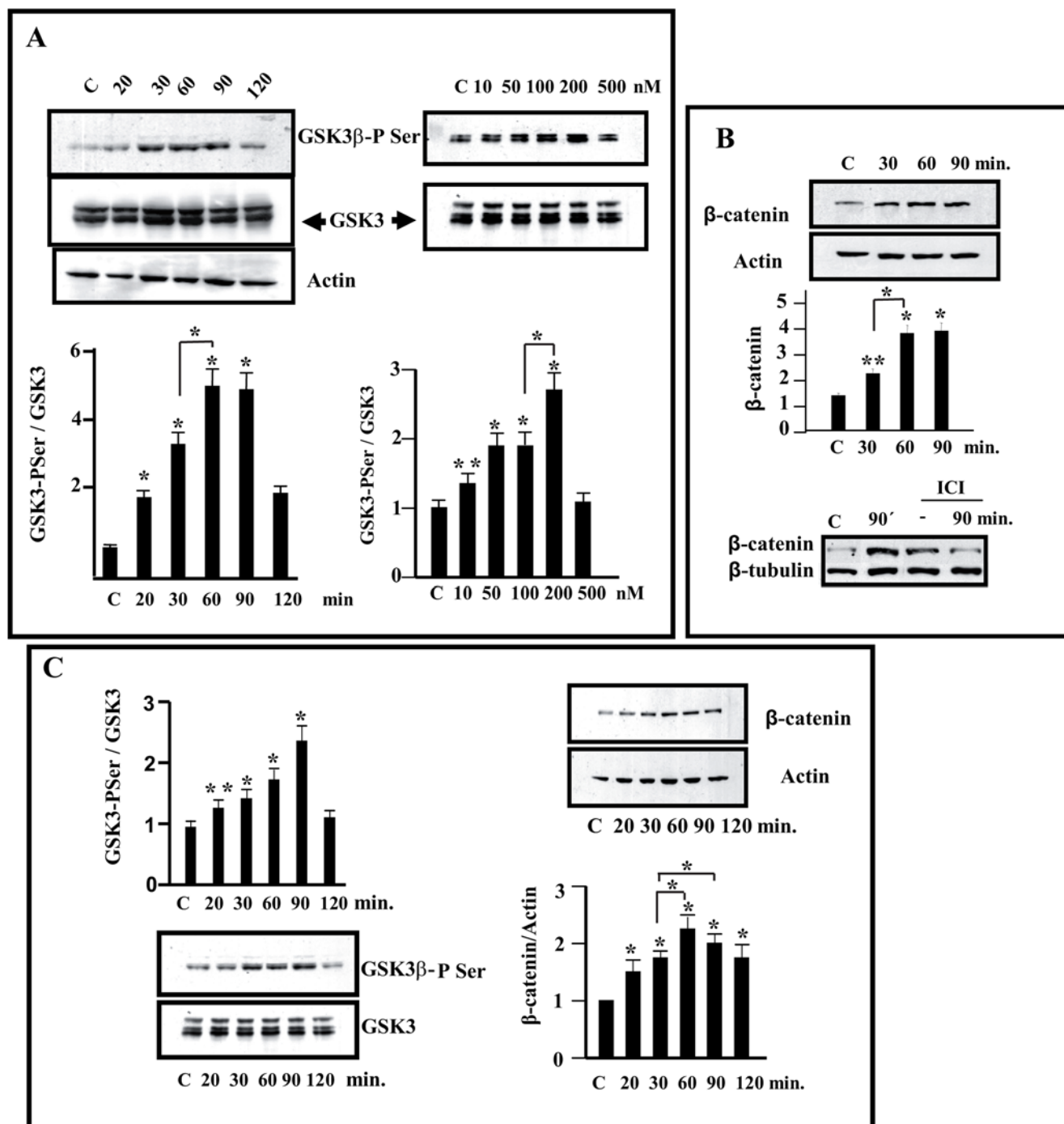


Figure 1. Treatment of estradiol increases Ser^{9,21}-GSK3 phosphorylation and β -catenin accumulation in neuronal cells. (A)- Neuroblastoma N2a-m were treated with different doses of estradiol and for different times (20–120 min with 10–500 nM) and the maximum increase in GSK3 β -P Ser⁹ was observed when they were treated for 60 min with 100–200 nM estradiol. **(B)-** Stabilization of β -catenin. N2a-m cells treated with estradiol showed a clear increase in β -catenin that could be prevented by prior exposure to ICI 182780 (used 100 \times concentrated in comparison to estradiol), 60 minutes before estradiol treatment (lower panel). **(C)-** Cortical Primary Neurons (2DIV) were treated with estradiol (100 nM) and the maximum increase in GSK3 β -P Ser⁹ and the subsequent stabilization of β -catenin was clearly detected 60–90 min after the onset of exposure. In all cases diagram shows the mean normalized densitometry values and the corresponding standard deviations from at least three independent experiments. Asterisks indicate statistical significance (Student's t-test) ** ($P \leq 0.05$), * ($P \leq 0.01$). The single * or ** compares data to control whereas the bar between different points shows statistical differences between experimental values.
doi:10.1371/journal.pone.0005153.g001

DPN, suggesting that ER α is more effectively coupled to this novel pathway (Figure 3D). As a positive control of this TCF-reporter, we took advantage of the fact that this neuronal cell

responds to some Wnt proteins and thus, β -catenin stabilization was detected when N2a-m cells were exposed to Wnt3a (Supplementary Figure S3). When we exposed cells to Wnt3a

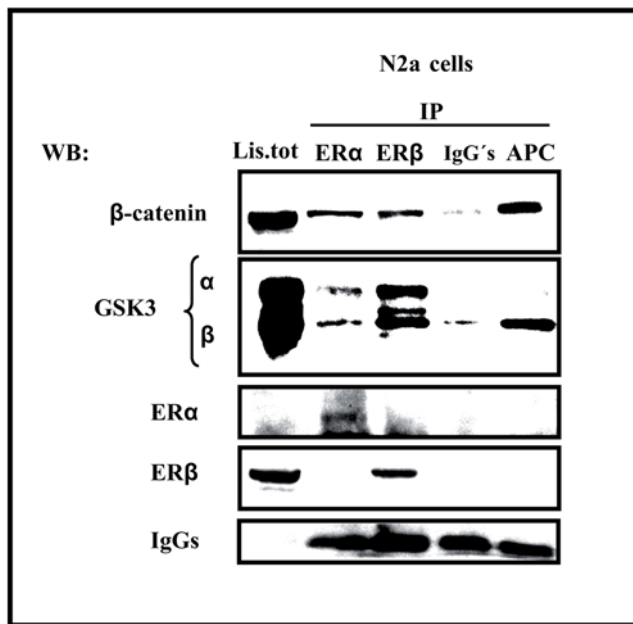


Figure 2. Estrogen receptors form a complex with β -catenin and GSK3 in N2a-m cells. ER α and ER β were immunoprecipitated from N2a-m cells, and similar endogenous protein complexes were observed with both antibodies. Immunoprecipitation with an anti-APC antibody is shown as an internal control of a β -catenin interacting protein. Both GSK3 isoforms were detected in the immunocomplex recovered with ER α or ER β antibodies, whereas GSK3 β is the major isoform recovered with APC antibodies, used as a positive control. The immunoprecipitation also shows a fraction of β -catenin associated with both ER isoforms. IgG's represent the IP using irrelevant IgGs as a negative control.

doi:10.1371/journal.pone.0005153.g002

after TOPFlash transfection, the transcriptional activation obtained in response to Wnt3a was similar to that obtained after estradiol treatment (Supplementary Figure S3).

The expression of a TCF- β -galactosidase reporter, as well as an engrailed-1 promoter luciferase reporter, is modulated by estradiol in primary neurons

To determine whether estradiol can regulate the expression of a reporter controlled by TCF in primary neurons, we used two complementary approaches. First, we transfected TOPFlash or FOPFlash into primary neurons (Figure 4A) and after TOPFlash transfection, we detected an increase in luciferase activity (4.8 ± 1.2 folds; $n = 3$) in the presence of estradiol (100 nM), which was not induced after FOPFlash transfection (Figure 4A). High concentrations of insulin (ITS supplements) also produced a 10-fold increase in these cells as a positive control (Figure 4A). In a second approach, we obtained primary cultures of cortical neurons from TCF- β gal transgenic mice, a colony designed to analyze the activation of the Wnt pathway in vivo [21]. We detected β -galactosidase expression in almost all cortical neurons of TCF- β gal transgenic mice (Figure 4B) and thus, we analyzed the amount of β -galactosidase after exposure to either estradiol or Wnt3a. Both estradiol and Wnt3a produced a similar moderate increase in β -galactosidase, assessed in western blots (Figure 4B). This finding was confirmed by quantitative RT-PCR in parallel experiments. Hence, in total RNA obtained from cultured cortical neurons, a similar increase in the expression of the LacZ-transgene was detected by RealTime RT-PCR after exposure to Wnt3a or estradiol when normalized to actin mRNA expression (Figure 4C).

As a complementary alternative we try to analyze whether an endogenous promoter may be regulated by estradiol in a similar fashion as Wnt3a. For that purpose we used a construct containing a 2.8 Kb region of the Engrailed-1 promoter that has three LEF-1 sites situated upstream of a luciferase gene pENP1Luc [22] (see scheme in Figure 5A). Again luciferase expression was clearly driven by estradiol, although at identical amounts of cDNA the response of TOPFlash was more potent (Figure 5B).

Does estradiol use a β -catenin/TCF transcription system similar to that used by Wnt?

The mechanism by which Wnt modulates β -catenin-mediated transcription is sensitive to the phosphorylation of β -catenin as well as to β -catenin/TCF binding (reviewed in [17]). Thus, when we transfected N2a-m cells with different amounts of a constitutively active mutant of β -catenin (S33Y), the transcriptional activity in extracts of these cells was almost maximal and it was virtually insensitive to the addition of estradiol (15–20%), when compared with 5–12 folds induction (control or mock-transfected cells *versus* estradiol) (Figure 6A *versus* Figure 3B–C). In all these experiments, the total amount of β -catenin after transfection and treatment was controlled to ensure that it did not influence the results (Figure 6B). Hence, these data strongly suggested that estradiol-mediated transcription requires the formation of a β -catenin/TCF complex. Indeed, when a version of LEF-1 that is truncated in the β -catenin binding region (Δ 56LEF-1) [23] was transiently transfected into N2a-m neuroblastoma cells in combination with TOPFlash, estradiol did not drive *luciferase* expression (Figure 6C), whereas N2a-m-mock transfected cells responded to estradiol as previously shown.

Similarly, when we transiently transfected into N2a-m neuroblastoma cells with Δ 56LEF-1 in combination with pENP1 Luc, the *luciferase* expression estradiol-mediated was severely reduced by the expression of LEF1-mutant (Figure 6D).

Are β -catenin/TCF-DNA complexes activated by estradiol?

To determine whether the estradiol-mediated transcriptional activation detected in our study relies on similar complexes to those described for Wnt, we assayed the DNA-protein complexes with TCF-binding sequence in nuclear extracts from N2a-m cells (EMSA assay). We detected a DNA-protein complex that was more evident after estradiol or Wnt3a treatment (Figure 7). Moreover, the formation of this complex was impaired by pre-incubation with the ER antagonist ICI 182780 and the detection of the complex could be competed with unlabelled TCF-oligonucleotide but not by a mutant TCF oligonucleotide (Figure 7 A).

Four members of TCF family have been described (TCF1, LEF-1, TCF3, and TCF4), the first three of which are found in neuronal tissues [24]. To determine which of these may participate in the TCF/DNA complex described in our system, we pre-incubated the nuclear extracts with specific antibodies against TCF1, LEF-1 or TCF3, as well as with antibodies against ER α or irrelevant IgGs. The antibody against LEF-1 abolished the formation of the DNA-protein complex while the antibodies against TCF1, TCF3 and ER α did not appreciably modify the DNA-protein complex (Figure 7B and supplementary Figure S4).

Are the genes regulated by estradiol/ β -Catenin/LEF-1 similar to those regulated by Wnt/ β -Catenin/TCFs?

Together, the data obtained so far suggested that estradiol might activate a β -Catenin/LEF-1 complex that is similar to that activated by Wnt in other systems. Thus, to shed further light on

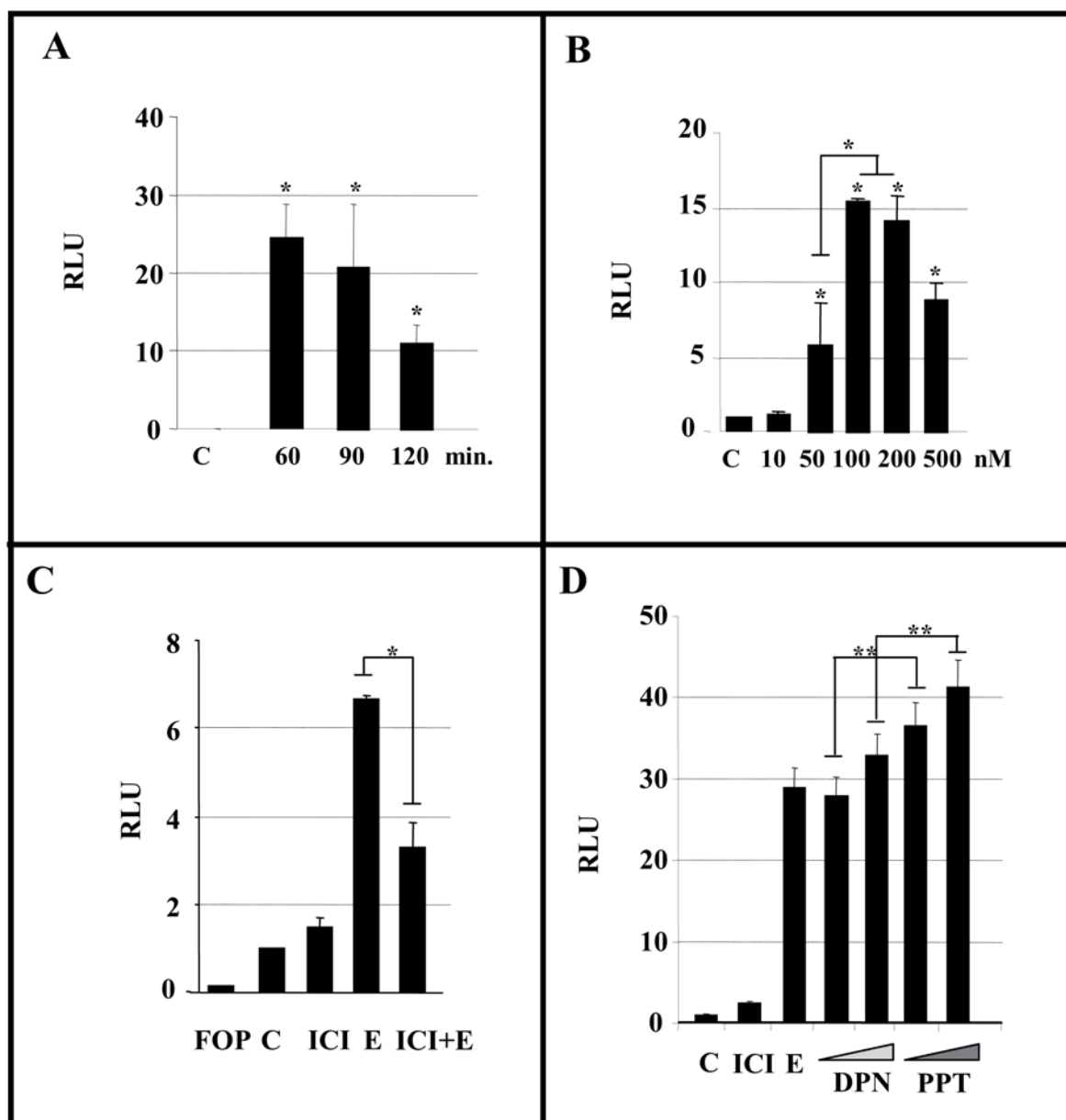


Figure 3. Estradiol augments TCF/LEF-dependent transcription in N2a-m cells. N2a-m cells were transfected with the TOPFlash or FOPFlash reporter plasmid with EGFP-pCDNA3, and the cells were then treated with estradiol and other test compounds for the different times and at the different concentrations indicated. (A–B), Soluble extracts from estradiol treated cells were obtained and *luciferase* activity was measured as indicated in the Methods. The normalized data were expressed in relative light units (RLU) compared to the control solvent, and the response was maximal at 60 min using 100 nM. (C), The effect of estradiol can be prevented by prior exposure to the ER antagonist ICI 182780 10 μ M for 2 hr. (D), Specific agonists of each estrogen receptor (PPT: ER α agonist, and DPN: ER β agonist, at two concentrations, 5 and 10 nM) also induced TCF/LEF-mediated transcription although PPT was more efficient than DPN. The graphs show the normalized *luciferase* activity from at least three independent experiments. The P value from the Student's t-test was * ($P \leq 0.05$), ** ($P \leq 0.01$). The single * or ** compares data to control whereas the bar between different points shows statistical differences between them. doi:10.1371/journal.pone.0005153.g003

this new molecular mechanisms, we took advantage of the fact that the Δ 56LEF-1 construct may act as a dominant-negative construct and we generated N2a-m cells stably transfected with Δ 56LEF-1 (Figure 8A). This cell line presented a more differentiated morphology, with bipolar extension of two processes (Figure 8A).

As an internal control, we analyzed the presence of the Δ 56LEF-1 as well as the endogenous LEF-1. The expression of Δ 56LEF-1 in this cell line was not drastically impaired, and it was maintained at an mRNA and protein ratio of at least 1:1 when compared with LEF-1, in a cell line *mock*-transfected with the

empty pcDNA3.1 vector (Figure 8B and C). The dominant-negative activity of the LEF-1 mutant was observed when the cell line was transiently transfected with TOPFlash. The expression of *luciferase* was still blocked when the cells were incubated with estradiol, as described previously (Figure 8C). Even though, estrogen receptor and β -catenin may be detected in the nuclear fraction of these transfected cells (Figure 8C).

Subsequently, stably transfected N2a-m cells were utilized to obtain the total RNA, either from *empty* pcDNA3/N2a-m (group A) or Δ 56LEF-1/N2a-m (group B). In both cases, cells were

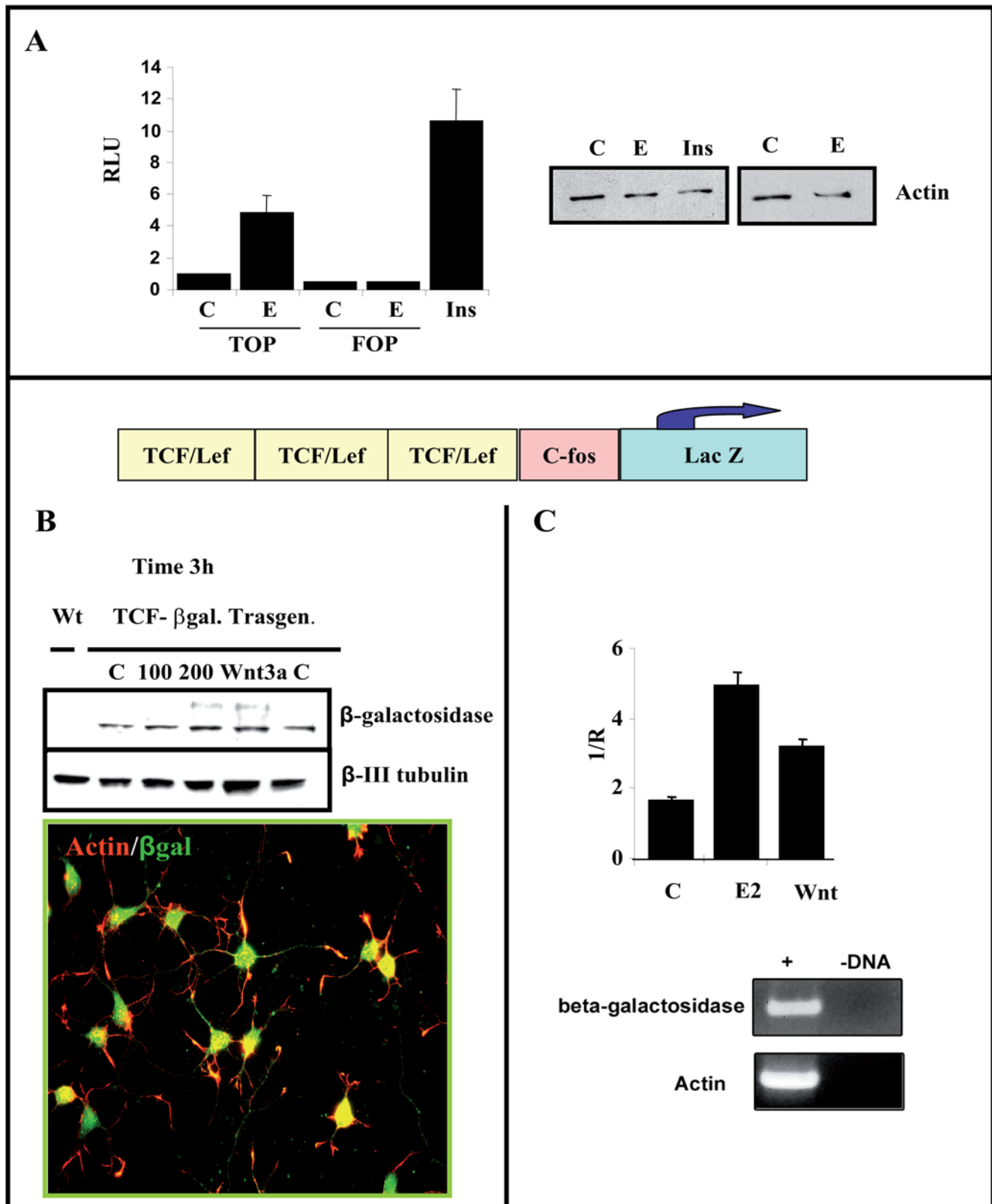


Figure 4. Estradiol increase TCF/LEF-dependent transcription in cortical neurons. (A)-Cortical neurons from E18 embryos were nucleofected with TOPFlash or FOPFlash reporter plasmids and luciferase activity was analyzed after 2DIV. Estradiol treatment (60 min, 100 nM) selectively increased transcription from the TOPFlash reporter plasmid compared to FOPFlash, which shows no activity. Insulin treatment (5 μ g/ml) was used as a control of induction. (B-C)- Expression of the **LacZ** gene in response to estradiol in transgenic mice. The scheme represents the **lacZ** transgene under the control of three consensus TCF/LEF-binding motifs upstream of the *c-fos* promoter, as described in *Materials and Methods*. (B)- Upper panel. Total extracts of cortical neurons (2DIV) were obtained from a TCF/LEF-lacZ transgenic mouse (see Materials and Methods) and the β -

galactosidase (β -gal) expression was assessed in western blots after estradiol treatment (100–200 nM) for 3 h. Wnt3a (20 ng/ml) was used as a control of TCF-mediated induction. A slight increase in β -gal protein was observed after exposure to estradiol, as with recombinant Wnt3a protein. **(B)**, Lower panel. Basal expression of β -galactosidase in neurons from transgenic mice was assessed by immunocytochemistry using specific antibodies against β -galactosidase (green) and Phalloidin-labelled with Alexas 549. **(C)**, Alternatively, after treatment with estradiol or Wnt3a, total Lac Z expression was quantified by RT-PCR using specific β -gal oligonucleotides and using actin (a housekeeping gene) as an internal standard (see *Methods*). The amplification of both genes was analyzed on agarose gels and the graph represents the normalized data obtained from the Lightcycler analysis. Both treatments clearly increase transcriptional activity when compared to controls.

doi:10.1371/journal.pone.0005153.g004

treated with estradiol or Wnt3a for 60 minutes and then total RNA was purified. Gene expression from the two stable cell types (*A* and *B*) was then analyzed using the Applied Biosystems Mouse Genome Survey Microarray (*Applied Biosystems*).

Genes were normalized with respect to control untreated cells, and divided in different groups. From these groups, we only consider those with differences when compared group **A** versus group **B**, for each treatment. From these we selected those with a $\log_2 R$ higher or lower than 1, being 102 genes upregulated and 121 genes downregulated by estradiol; and 137 genes upregulated and 166 genes downregulated by Wnt3a. **Table 1** described the list of the annotated genes present in the protein bank with the *Ref Seq* and the *Gene Name*. In contrast, the genes modified only after estradiol treatment or only after Wnt3a treatment that presented no significant differences between **A** and **B** were discarded. Initially, for the confirmation of the putative differential response of both cells (*A* vs *B*) we selected two genes presented in both

arrays that were modified by Wnt as well as by estradiol (Plasminogen and LEF-1). A final validation was performed using specific antibodies against the selected proteins (Figure 9 and 8C). Thus, plasminogen expression in $\Delta 56$ LEF-1 cells was 2.5 fold higher, although these initial differences were not considerably augmented by treatment with Wnt or estradiol. Similarly, the endogenous LEF-1 was reduced by the presence of the mutant version of this protein (Figure 8). In addition we selected some genes, previously reported by other laboratories as Wnt targets, such as TCF's, Cyclin D, Myc, MMP's (for updated, please check, The Wnt Homepage, at <http://www.stanford.edu/~musse/pathways/targets.html>).

As shown in figure 9A, the $\log_2 R$ of some of these genes was low, and certainly, the protein expression showed no differences. Considering that the low level of detection may be related with the short exposure time (60 minutes), we extended the treatment to confirm the differential regulation of some genes mediated by

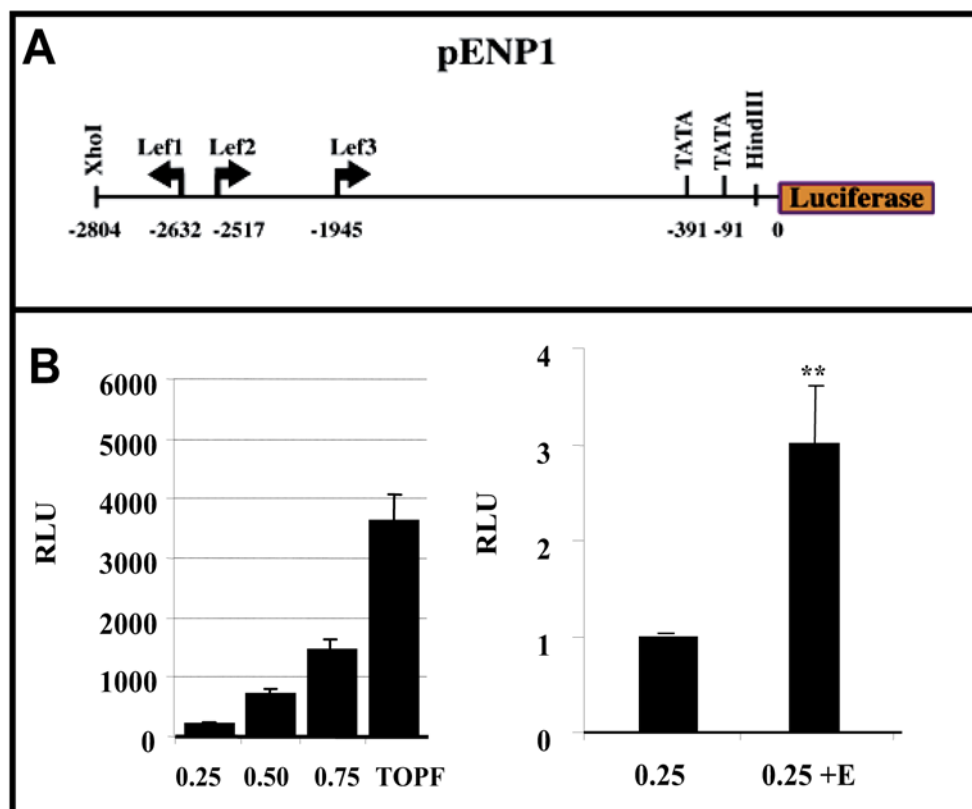


Figure 5. The engrailed 1-luciferase construct responds to estradiol. The scheme represents the structure of the 2.8 kb of construct containing the proximal region of endogenous *engrailed 1* promoter bind to luciferase reporter. N2a-m cells were transfected with the pENP1-luciferase reporter plasmid (250, 200 and 750 ng) (represented as **0.25**, **0.5**, **0.75**), which contains three LEF-1 sites (see upper panel). The Lower panel shows a comparison of the induction of TOPFlash (750 ng) and pENP1-luc in this cell line. Although basal levels of luciferase activity are lower in the pENP1-luc reporter plasmid, estradiol induces this activity to 3-fold that of the control levels, as shown in the right panel. The graph in **B** shows the normalized *luciferase* activity from at least three independent experiments. The P value from the Student's t-test was ** ($P \leq 0.01$) when compared with control data.

doi:10.1371/journal.pone.0005153.g005

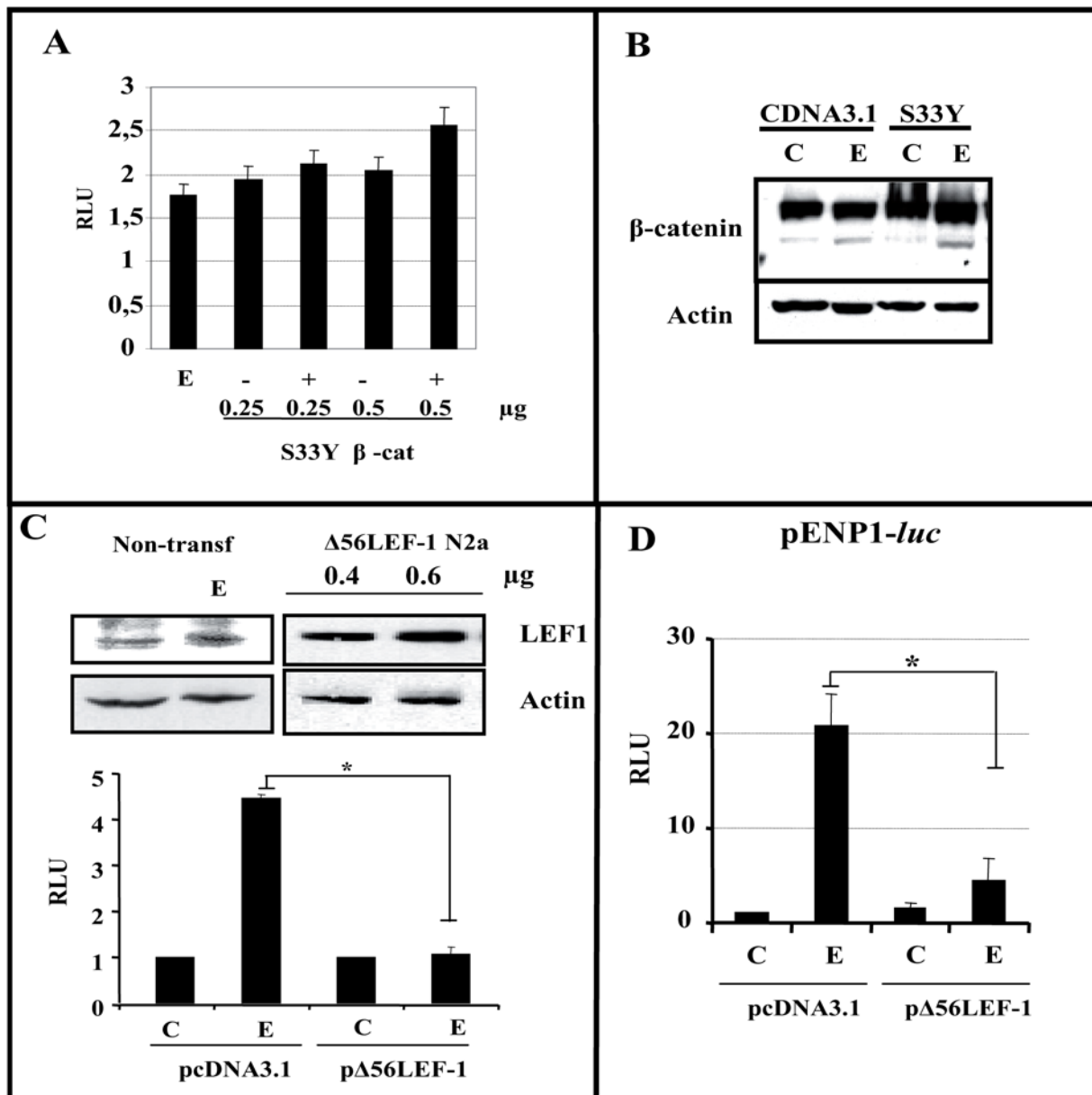


Figure 6. Interaction of β -catenin/LEF-1 mediates the transcriptional capacity of estradiol. (A)– β -catenin/TCF estradiol-mediated transcription depends on the phosphorylation of β -catenin. N2a-m cells were transfected with different amounts of the S33Y- β -catenin (S33Y- β -cat) expression plasmid as indicated (250 or 500 ng). (B)– β -catenin levels in total extracts from cells transfected with S33Y- β -cat or the empty cDNA3.1 plasmid, representative of the analysis of lanes (0.5+); and (0.5–) in A. Under the high levels of S33Y- β -cat expression estradiol was virtually unable to further induce reporter expression. No statistical differences are founded between the bars data from different experiments. (C)–Interaction of β -catenin with TCFs is essential for estradiol to induce gene transcription through TCF sites. Endogenous LEF-1 protein levels remain unchanged after estradiol treatment for 60–90 min, as seen with the anti-N terminal LEF-1 antibody. Expression of the Δ 56LEF-1 protein was detected in western blots after transfection of increasing amounts of plasmid (400 or 600 ng) using an antibody against the HMG box region of LEF-1. The overexpression of a LEF-1 mutant construct (Δ 56LEF-1) prevents estradiol from inducing expression from the TOPFlash reporter plasmid when compared with mock-transfected cells. (D)– Δ 56LEF-1 reduces estradiol induced luciferase expression from pENP1-*luc*. The overexpression of Δ 56LEF-1 construct reduced the luciferase activity induced by estradiol from the pENP1-Luc plasmid, when compared with mock-transfected cells (empty-pcDNA3). Estradiol (E) induced luciferase activity to 8–15 fold that of the control levels (C and E), in the pENP1-*luc* reporter. However, the expression of Δ 56LEF-1 diminished this induction (compare pcDNA3+E versus Δ 56+E). In both cases (C–D), the graphs show the normalized luciferase activity (RLU) from at least three independent experiments. The P value from the Student's t-test was * ($P \leq 0.05$). doi:10.1371/journal.pone.0005153.g006

Δ 56LEF-1. Accordingly, we treated the cell lines with estradiol or Wnt3a over a period of 24 h to allow for the accumulation of the protein. Soluble fraction, or nuclear fractions, or conditioned medium was obtained from treated cells and we analyzed the genes identified as differentially expressed in the microarray (when

antibodies were available) as well as some genes known to be regulated by Wnt, such as E-cadherin, β -catenin or cyclin D.

Our data confirmed some of the variations in the genes described. Interestingly, MMP-2 secretion was most prominent in Wnt-treated cells whereas the proactive form appeared to be

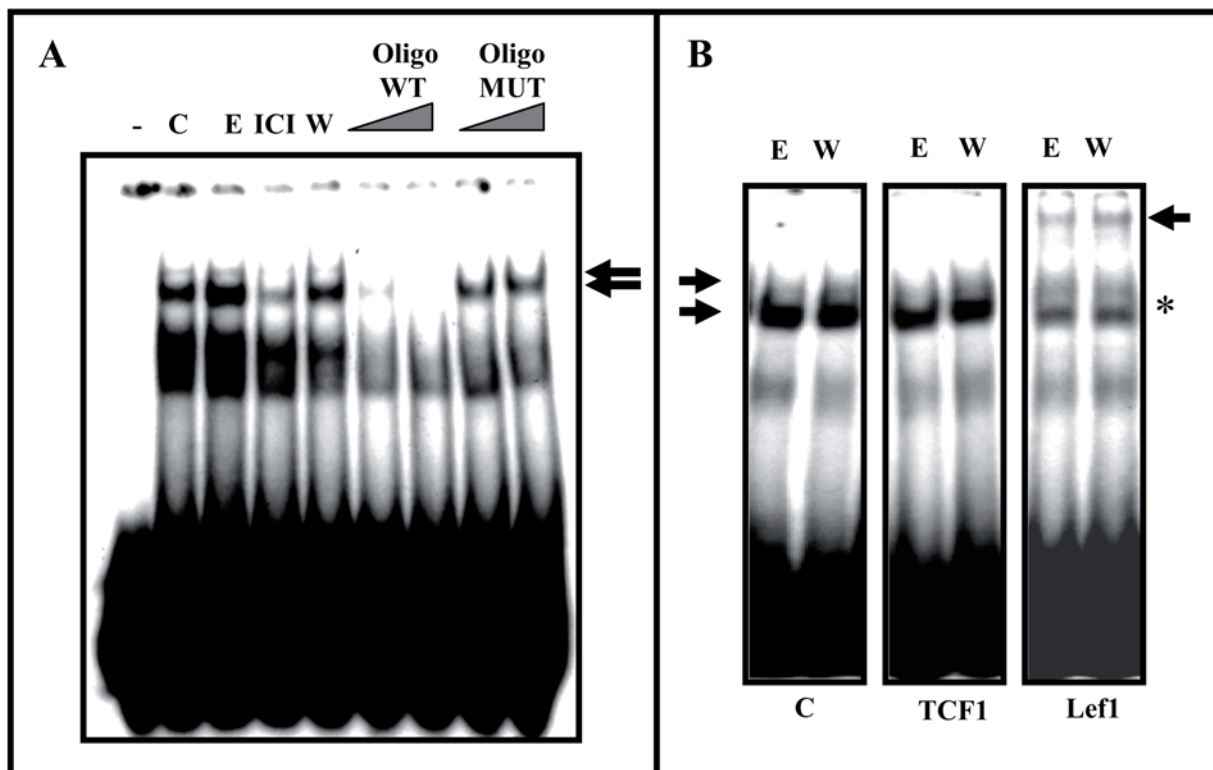


Figure 7. The LEF-1-DNA complex is detected in nuclear protein extracts and it is modulated by estradiol. (A)-Identification of the specific band by competition with non-labeled wt oligonucleotides. Nuclear proteins were obtained from N2a-m cells treated for 30 minutes with estradiol, ICI or Wnt3a, enabling specific TCF-DNA complexes to be detected. In control nuclear extracts the presence of a pre-established TCF-DNA complex was detected, which augmented slightly in the presence of estradiol and that decreased upon ICI treatment. The arrow indicates the complex. (B)-Analysis of the identity of the TCF-DNA complex. Antibodies against TCF1, LEF-1, or irrelevant IgGs (C) were added to the nuclear protein extracts and modification of the DNA/protein complex was evaluated. In addition, antibodies against TCF3 or ER α were used in parallel experiments, without producing any modification of this pattern (Supplementary Figure S4). Only in the case of the anti-LEF-1 antibody was a more slowly migrating band observed. The arrow with an asterisk indicates the appearance of a higher molecular weight complex.
doi:10.1371/journal.pone.0005153.g007

secreted prominently by Δ 56LEF-1/N2a-m cells. Similarly, β -catenin displayed weaker protein expression in Δ 56LEF-1/N2a-m cells, independently of the treatment.

Finally, a second set of genes were found, those that respond to estradiol (and/or Wnt) in control cells and whose regulation was modified by the presence of Δ 56LEF-1. Indeed, longer treatment enabled clear differences to be detected at the protein level in genes such as N-cadherin and Cyclin D2. Our data indicated that N-cadherin was upregulated by estradiol and Wnt, and that the expression of Δ 56LEF-1 almost completely blocked these effects (Figure 9B). While Cyclin D2 behaved similarly, Cyclin D1 appeared to be unchanged and unaffected by treatments (Figure 9B). On the other hand, E-cadherin was upregulated by estradiol in control cells (Group A), whereas the presence of Δ 56LEF-1 generated an uncontrolled upregulation. This result revealed an important role for LEF-1 in estrogen-regulated E-cadherin expression.

Discussion

Estrogens may act through different mechanisms, the best known of which involves their capacity to directly bind to and dimerize estrogen receptors (ERs). This hormone-protein complex can either bind directly to promoter estrogen response elements (EREs), or act as a cofactor at non-ERE sites through the interaction with other DNA-binding elements, such as AP-1, or c-Jun [5,25–26]. A second mode of action is associated with the so-

called “non genomic” or “rapid” actions, that include the activation of PKC, G-protein-coupled receptors, ERKs and PI3K/Akt in different cell systems [8,27]. Regarding this theme, we recently reported that ER α forms a protein complex with GSK3 and β -catenin in the hippocampus of ovariectomized rats; the action of estradiol dissociated β -catenin from the complex in a manner that was clearly correlated with the inhibition of GSK3 [12]. The interaction of ER α with GSK3 does not appear to be specific for neurons and indeed, it has recently been demonstrated that ER α is also phosphorylated and modulated by GSK3 in other cell types [28].

Estradiol, through a “rapid response”, activated the pathway Akt/GSK3, stabilized β -catenin, and modulates TCF-mediated transcription, in neurons

We had initially found that the inhibition of GSK3 by estradiol was correlated with the stabilization of β -catenin. Thus, our first aim here was to determine whether the pool of β -catenin regulated by estradiol acts as a co-transcriptional modulator using canonical TCF-mediated transcription or alternatively, whether the stabilization of β -catenin plays some other role. With this aim, we selected a neuronal cell line easily amenable to transfection with a TCF-reporter: the N2a-m cell line which expresses the α and β ER receptors and accumulates nuclear ER when treated with estradiol. Significantly, we detected a complex of β -catenin and GSK3 in these cells following exposure to either ER α or ER β .

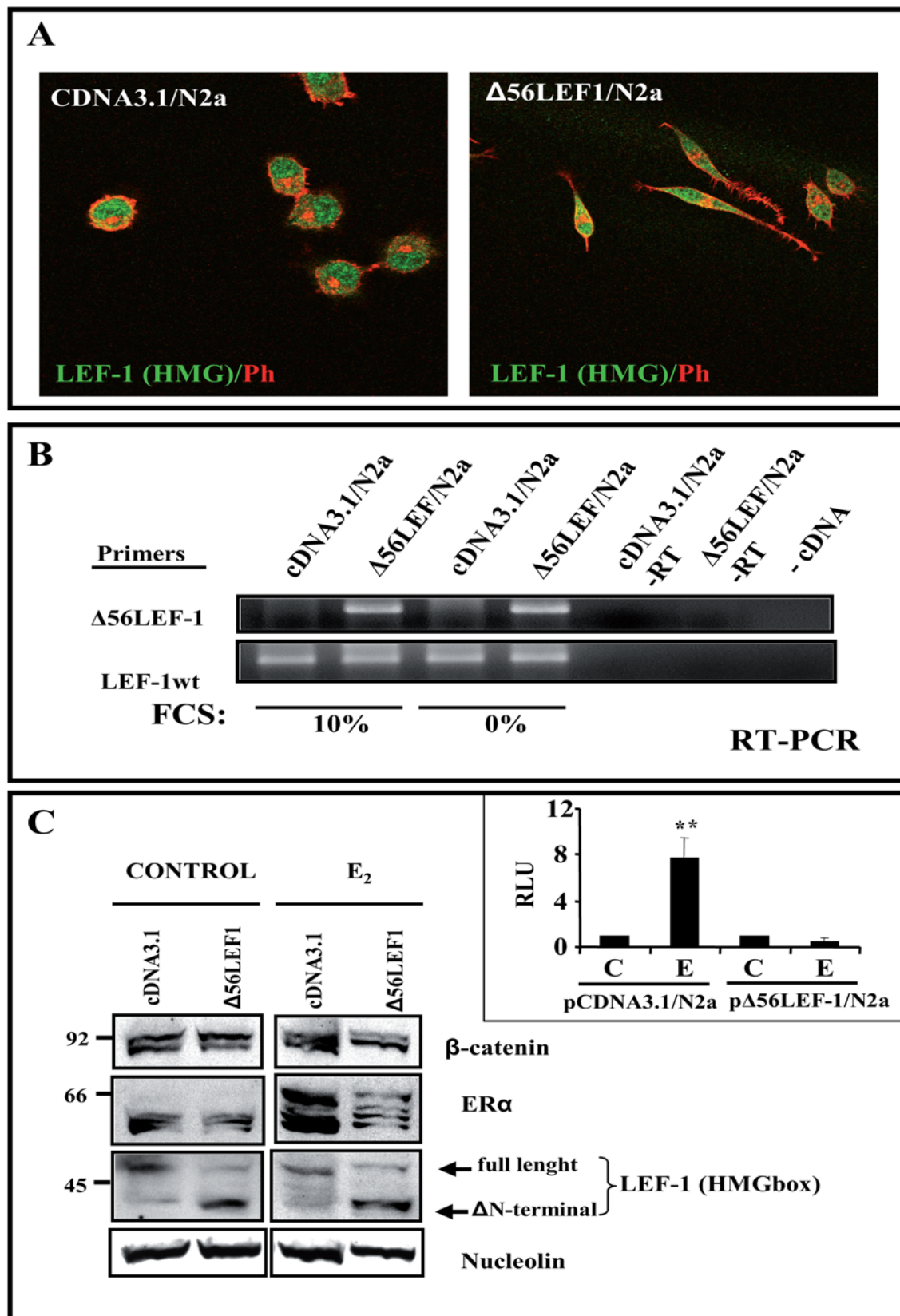


Figure 8. Generation of a stable N2a-m cell line expressing the $\Delta 56$ LEF-1 protein. N2a-m cells were co-transfected with $\Delta 56$ LEF-1 or the empty pCDNA3 vector containing the Puromycin resistance gene (for details see *Methods*). **(A)**— N2a-m- $\Delta 56$ LEF-1 expression was observed by dual immunocytochemistry using an LEF-HMGbox antibody (green) and Phalloidin (red). Note the morphological changes associated with the expression of LEF-1 mutant. **(B)**— RNA from the different stable N2a-m cell lines was obtained and the RT-PCR products were analyzed in agarose gels. Expression

of the Δ 56LEF-1 plasmid was tested using oligos specific to the Δ 56LEF-1 plasmid, in parallel with specific oligos recognizing endogenous LEF-1 protein (LEF-1-wt) as controls. Note that no significant differences in plasmid expression were observed between cells growing in 10% FCS compared to those grown in the absence of FCS. **(C)**—Protein expression was determined to test for the presence of the mutant LEF-1 protein in N2a-m cells. Nuclear extracts were prepared from control and estradiol treated cells, and little accumulation of β -catenin was detected after exposure to estradiol although the estrogen receptor does enter the nucleus. The LEF-HMG box antibody allows us to differentiate full-length LEF-1 from Δ 56 LEF-1 in western blots. Nucleolin levels were used as an internal control. The right insert represents the luciferase activity (RLU) of both stable cell lines. A functional analysis was performed to check the loss of estradiol induction over TOPFlash in these cells, as previously reported for the transient transfection (Figure 6C). The graph shows the normalized luciferase activity from at least three independent experiments. The P value from the Student's t-test was ** ($P \leq 0.01$) when compared with control data. doi:10.1371/journal.pone.0005153.g008

When N2a-m or cortical neurons were treated with estradiol, we detected a similar biochemical response with an increase of GSK3 serine phosphorylation as well as the stabilization of β -catenin. This inhibition of GSK3 was time- and concentration-dependent, and these data are in essence similar to those described in the hippocampus of ovariectomized rats after estradiol treatment, or in hippocampal neurons [12].

Taking into account these initial results, the question arose as to whether β -catenin stabilized by estradiol might modulate transcription. It is believed that β -catenin has two different and complementary roles in cells; it may contribute to the cell-cell adhesion or it may act as a co-transcriptional regulator of the TCF family [16–19]. Our data first showed that estradiol activated TCF-mediated transcription at concentrations of 10×10^{-9} M. This nuclear activation of luciferase was time- and concentration-dependent, it was maximal at $10\text{--}20 \times 10^{-8}$ M, and it could be abolished by the ER antagonist ICI 182780. Similar, but slightly weaker transcriptional activation could be obtained with the ER α -selective agonist, PPT (5–10 nM), as well with the ER β -selective agonist, DPN (5–10 nM). All these data strongly suggested that estradiol stabilizes β -catenin through ER α and ER β , and that at least a portion of this protein pool can activate transcription. This transcriptional activation depended on the phosphorylation status of β -catenin. Indeed, the highest levels of transcription were obtained with a mutated form of β -catenin (S33Y) that was virtually unaffected by estradiol. These data raise the question as to whether this TCF- β -catenin mediated transcription is similar to that obtained with Wnt proteins.

We have also showed that estradiol may activate transcription from a portion of the *engrailed-1* promoter that contains well characterized TCF elements (pENP1-*luc*) (McGrew et al. 1999), and also activate transcription in primary neurons derived from mice transgenic for a TCF- β -galactosidase reporter driving the expression of a luciferase reporter. It is important to remember that the estradiol-dependent transcription mediated by pENP1-*luc* is severely inhibited by the expression a LEF-1 truncated-mutant (Δ 56LEF-1) [23]. We found that estradiol slightly augmented the formation of DNA-TCF complexes, a similar effect to that produced by exposure to Wnt3a. This transcriptional activation is dependent on LEF-1, since antibodies against LEF-1 can disrupt DNA-complex formation. Furthermore, the presence of Δ 56LEF-1 almost completely prevented estradiol-mediated transcription.

It was recently demonstrated that estradiol regulates LEF-1 and Tcf3, and more importantly, that a complex containing ER α and Tcf3/LEF-1 may be immunoprecipitated from mouse uterus extracts [29]. Accordingly, it was proposed that a complex composed of ER α / β -catenin/Tcf-3 is an important part of the estradiol response in this tissue. Although we cannot completely rule out this possibility (particularly since we did not use the same methodology), in our experiments LEF-1 was not immunoprecipitated when antibodies against either ER α or β were used. Only antibodies against LEF-1 prevented the formation of a DNA-protein complex in EMSA assays, unlike antibodies against Tcf 3 or ER α . Indeed, the initial cytoplasmic ER α / β -catenin/GSK3

complex appears to be different, with the complex in uterus being arranged (assembled?) after hormone addition, while in neural cells and neurons the complex is detected even prior to hormone treatment.

Further studies will be required to clarify whether the same ER α / β -catenin/Tcf-3 complex observed in the uterus is also present in neurons or in some specific brain regions. It will be interesting analyzing other possible components that might mediate the effect of the estrogen receptor on TCF/LEF-1 transcription, such as transducin beta-like protein 1 (TBL1) and its highly related family member TBLR1 [30]; among many others (see reviewed in [16–19]). A different point worthy of mention is that we detected multiple ER α bands in N2A cell extracts and after estradiol treatment only some of them appear to move into the nuclear fraction. This observation opens some interesting questions about the molecular nature of these multiple bands and why only some of them are mobilized. We are currently initiating the study of these ER α isoform/s in order to clarify the different possibilities suggested by the bibliography (isoform *versus* proteolysis?) [31–32].

Several publications have recently emerged in which new elements have been described that regulate the Wnt- β -catenin pathway. For example, c-Jun forms a complex with β -catenin and Dvl in the nucleus, and this association regulates the transcriptional activity of β -catenin [33]. Moreover, Rac1-JNK2 appears to act as a novel modulator of β -catenin mediated transcription [34]. Thus, the complex regulation of β -catenin is becoming more evident, as it is not only modulated through its cellular distribution or phosphorylation, but also by the proteins with which it associates. Here, we describe a novel pathway that regulates β -catenin/TCF activity through a ligand, estradiol, using at least some of the components of the original Wnt pathway.

Is the gene expression through LEF-1/ β -catenin estradiol-mediated similar to those triggered by Wnt?

To determine more specifically whether estradiol can regulate gene expression using the TCF/LEF-1- β -catenin system in a way similar to that of Wnt3a, we generated N2a-m cells stably transfected with Δ 56LEF-1 cDNA. By analyzing the gene expression profile of these cell lines on an Applied Biosystems Mouse Genome Survey Microarray, we detected 223 genes modified by estradiol; whereas Wnt3a modified 303 genes, sensitive to Δ 56LEF-1 (see **Table 1**, containing only the annotated sequences).

To validate these changes, at the protein level, we had to extend the treatment period and as a result, we selected some representative genes from our array, such as *Ptg* as well as some genes that have been previously associated with Wnt stimuli, such as E-Cadherin [35], Cyclin D [36–38], c-myc [39], LEF-1 [40–41] and TCF-1 [42]. We used commercially available antibodies to validate the changes in the levels of these proteins in the presence of Δ 56LEF-1 and/or the hormone or Wnt. Our data revealed two major types of response: first, those genes modified initially by the

Table 1. Results of the Microarray analysis of gene transcription.

UPREGULATED:		
RefSeq_NM	est_A vs B	Gene_Name
NM_007990.1	2,739	Finkel-Biskis-Reilly murine sarcoma virus (FBR-MuSV) ubiquitously expressed (fox derived)
NM_133198.1	2,676	liver glycogen phosphorylase
NM_130888.1	2,457	nuclear RNA export factor 7
NM_025703.2	2,439	RIKEN cDNA 3930402F23 gene
NM_183271.1	2,181	RIKEN cDNA 1700049M11 gene
NM_008877.2	2,039	plasminogen
NM_007407.2	2,034	adenylate cyclase activating polypeptide 1 receptor 1
D87975.1	1,994	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade F, member 1
NM_019703.2	1,890	phosphofructokinase, platelet
NM_010480.4	1,847	heat shock protein 1, alpha
NM_054095.1	1,846	EF hand calcium binding protein 2
NM_013779.1	1,701	melanoma antigen, family L, 2
NM_021389.3	1,653	SH3-domain kinase binding protein 1
NM_009529.1	1,509	Xlr-related, meiosis regulated
NM_133362.1	1,491	erythroid differentiation regulator 1
NM_183294.1	1,487	cyclin-dependent kinase-like 1 (CDC2-related kinase)
NM_007833.1	1,462	decorin
BC053970.1	1,337	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1, alpha/beta subcomplex, 1
NM_008144.3	1,335	Bernardinelli-Seip congenital lipodystrophy 2 homolog (human)
NM_033325.1	1,332	lysyl oxidase-like 2
NM_175027.2	1,321	cDNA sequence BC022692
NM_146034.1	1,316	meningioma expressed antigen 6 (coiled-coil proline-rich)
NM_177752.2	1,313	hypothetical protein 6820428D13
NM_025437.2	1,298	eukaryotic translation initiation factor 1A, Y-linked
NM_019768.2	1,291	mortality factor 4 like 2
NM_008590.1	1,251	mesoderm specific transcript
NM_019647.3	1,247	ribosomal protein L21
NM_031174.2	1,246	Down syndrome cell adhesion molecule
NM_009093.1	1,237	ribosomal protein S29
NM_008200.1	1,225	histocompatibility 2, D region locus 4
NM_008033.2	1,222	farnesyltransferase, CAAX box, alpha
NM_026712.1	1,216	RIKEN cDNA 0610030H11 gene
NM_183203.1	1,202	hypothetical protein 9130430E04
NM_145628.2	1,200	ubiquitin specific protease 11
NM_207204.1	1,188	RIKEN cDNA 4930519N13 gene
NM_025695.2	1,178	SMC6 structural maintenance of chromosomes 6-like 1 (yeast)
NM_008183.2	1,177	glutathione S-transferase, mu 2
NM_145526.1	1,173	purinergic receptor P2X, ligand-gated ion channel, 3
NM_012035.1	1,136	transient receptor potential cation channel, subfamily C, member 7
NM_010206.1	1,135	fibroblast growth factor receptor 1
NM_146035.1	1,122	mannoside acetylglucosaminyltransferase 2
NM_175930.2	1,118	Rap guanine nucleotide exchange factor (GEF) 5
NM_013819.1	1,111	histocompatibility 2, M region locus 3
NM_008666.1	1,094	myelin transcription factor 1-like
NM_029823.1	1,092	RIKEN cDNA 6530401D17 gene
NM_172758.1	1,090	cDNA sequence BC031853
AK040457.1	1,085	interleukin 27 receptor, alpha
NM_194355.1	1,079	spire homolog 1 (Drosophila)
NM_007881.4	1,072	dentatorubral pallidolysian atrophy

Table 1. cont.

UPREGULATED:		
RefSeq_NM	est_A vs B	Gene_Name
NM_025522.1	1,064	dehydrogenase/reductase (SDR family) member 7
NM_008549.1	1,063	mannosidase 2, alpha 1
NM_010545.2	1,058	Ia-associated invariant chain
NM_008810.2	1,058	pyruvate dehydrogenase E1 alpha 1
NM_175007.1	1,044	amphiphysin
NM_028270.2	1,029	aldehyde dehydrogenase 1 family, member B1
NM_008737.1	1,024	neuropilin
NM_008666.1	1,023	myelin transcription factor 1-like
NM_025932.1	1,016	synapse associated protein 1
NM_010195.1	1,006	G protein-coupled receptor 49
DOWNREGULATED:		
RefSeq_NM	est_AvsB	Gene_Name
NM_019932.1	−3,893	chemokine (C-X-C motif) ligand 4
NM_010703.2	−2,642	lymphoid enhancer binding factor 1
NM_013492.1	−2,293	clusterin
NM_011702.1	−2,053	vasoactive intestinal polypeptide
NM_010685.2	−1,992	lysosomal membrane glycoprotein 2
NM_011333.1	−1,986	chemokine (C-C motif) ligand 2
NM_010658.2	−1,809	v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene family, protein B (avian)
NM_010515.1	−1,705	insulin-like growth factor 2 receptor
AK033214.1	−1,677	G elongation factor
BC053489.1	−1,557	insulin-like growth factor 2
NM_023422.1	−1,438	histone 1, H2bc
AK027922.1	−1,427	glutathione S-transferase omega 1
NM_177708.3	−1,420	reticulon 4 receptor-like 1
NM_175395.2	−1,418	RIKEN cDNA 1700001A24 gene;RIKEN cDNA 6330578E17 gene
NM_053273.1	−1,410	tweety homolog 2 (Drosophila)
NM_009344.1	−1,395	pleckstrin homology-like domain, family A, member 1
NM_011844.3	−1,349	monoglyceride lipase
NM_009776.1	−1,346	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade G, member 1
NM_021274.1	−1,339	chemokine (C-X-C motif) ligand 10
NM_021897.1	−1,337	transformation related protein 53 inducible nuclear protein 1
NM_138683.1	−1,303	thrombospondin type 1 domain containing gene
NM_010789.1	−1,292	myeloid ecotropic viral integration site 1
NM_016867.1	−1,291	semaF cytoplasmic domain associated protein 2
BC058269.1	−1,290	RAR-related orphan receptor beta
NM_007635.2	−1,279	cyclin G2
NM_015818.1	−1,275	heparan sulfate 6-O-sulfotransferase 1
NM_026416.2	−1,261	S100 calcium binding protein A16
NM_145825.1	−1,260	centrin 4
AK035160.1	−1,252	heart and neural crest derivatives expressed transcript 2
NM_028535.1	−1,251	RIKEN cDNA 1700049E17 gene
AK031672.1	−1,246	DNA segment, Chr 11, ERATO Doi 498, expressed
NM_178405.2	−1,233	ATPase, Na ⁺ /K ⁺ transporting, alpha 2 polypeptide
NM_172854.1	−1,213	RIKEN cDNA 4932431K08 gene
NM_009242.1	−1,180	secreted acidic cysteine rich glycoprotein
NM_021537.2	−1,172	serine/threonine kinase 25 (yeast)

Table 1. cont.

DOWNREGULATED:		
RefSeq_NM	est_AvsB	Gene_Name
NM_008250.1	–1,167	H2.0-like homeo box gene
NM_008538.2	–1,167	myristoylated alanine rich protein kinase C substrate
NM_026793.1	–1,166	myc target 1
NM_011353.1	–1,163	small EDRK-rich factor 1
NM_026358.1	–1,160	RIKEN cDNA 4930583H14 gene
NM_009726.2	–1,158	ATPase, Cu++ transporting, alpha polypeptide
NM_194268.2	–1,155	one cut domain, family member 2
NM_011295.2	–1,142	ribosomal protein S12
NM_175103.2	–1,135	RIKEN cDNA 1110025L05 gene
NM_025836.1	–1,130	mannose-6-phosphate receptor binding protein 1
NM_025692.1	–1,127	ubiquitin-activating enzyme E1-domain containing 1
NM_025394.1	–1,126	translocase of outer mitochondrial membrane 7 homolog (yeast)
NM_028279.1	–1,125	N-acetylated alpha-linked acidic dipeptidase 2
NM_133780.2	–1,125	translocated promoter region
NM_013660.1	–1,120	sema domain, immunoglobulin domain (Ig), transmembrane domain (TM) and short cytoplasmic domain, (semaphorin) 4D
NM_013692.1	–1,120	TGFB inducible early growth response 1
NM_010357.1	–1,119	glutathione S-transferase, alpha 4
NM_018865.1	–1,108	WNT1 inducible signaling pathway protein 1
NM_010317.2	–1,107	guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 4 subunit
NM_173788.2	–1,101	natriuretic peptide receptor 2
NM_175238.4	–1,089	DNA segment, Chr 2, ERATO Doi 145, expressed
NM_011313.1	–1,088	S100 calcium binding protein A6 (calcyclin)
NM_025735.1	–1,080	microtubule-associated protein 1 light chain 3 alpha
NM_178751.2	–1,080	RIKEN cDNA A730041O15 gene
NM_030037.1	–1,078	motile sperm domain containing 3
NM_017367.2	–1,078	cyclin I
NM_133218.1	–1,077	glucocorticoid induced gene 1
AK010069.1	–1,075	DNA segment, Chr 7, Wayne State University 87, expressed
NM_026033.1	–1,074	ocular development associated gene
NM_021398.1	–1,070	solute carrier family 43, member 3
NM_174988.2	–1,063	cadherin 22
NM_026111.2	–1,043	RIKEN cDNA 1810019P04 gene
NM_012057.1	–1,042	interferon regulatory factor 5
AK076923.1	–1,042	protein phosphatase 1B, magnesium dependent, beta isoform
NM_133859.1	–1,040	olfactomedin-like 3
NM_026565.2	–1,038	RIKEN cDNA 9430083G14 gene
NM_133942.1	–1,037	expressed sequence AA960558
AK003039.1	–1,030	glycolipid transfer protein
NM_008967.1	–1,022	prostaglandin I receptor (IP)
NM_023649.1	–1,020	Usher syndrome 1C homolog (human)
NM_025946.2	–1,013	RIKEN cDNA 2010100O12 gene
NM_009113.2	–1,010	S100 calcium binding protein A13
NM_027285.1	–1,009	RIKEN cDNA 1700029I01 gene
NM_172296.1	–1,009	doublesex and mab-3 related transcription factor like family A2
NM_009814.1	–1,007	calsequestrin 2
NM_013765.1	–1,005	ribosomal protein S26
NM_011952.1	–1,003	mitogen activated protein kinase 3

Table 1. cont.

DOWNREGULATED:			
RefSeq_NM	est_AvsB	Gene_Name	
NM_010831.1	−1,001	SNF1-like kinase	
UPREGULATED:			
RefSeq_NM	Wnt_AvsB	Gene_Symbol	Gene_Name
NM_007990.1	3,603	Fau	Finkel-Biskis-Reilly murine sarcoma virus (FBR-MuSV) ubiquitously expressed (fox derived)
NM_133198.1	2,620	Pygl	liver glycogen phosphorylase
NM_019703.2	2,343	Pfkip	phosphofructokinase, platelet
NM_007407.2	2,294	Adcyap1r1	adenylate cyclase activating polypeptide 1 receptor 1
NM_025703.2	2,270	3930402F23Rik	RIKEN cDNA 3930402F23 gene
NM_183271.1	2,215	1700049M11Rik	RIKEN cDNA 1700049M11 gene
BC053970.1	2,198	Ndubaf1	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1, alpha/beta subcomplex, 1
NM_130888.1	2,106	Nxf7	nuclear RNA export factor 7
D87975.1	2,052	Serpinf1	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade F, member 1
NM_021389.3	1,966	Sh3kbp1	SH3-domain kinase binding protein 1
NM_054095.1	1,910	Efcbp2	EF hand calcium binding protein 2
NM_133362.1	1,797	Erdr1	erythroid differentiation regulator 1
NM_177752.2	1,682	6820428D13	hypothetical protein 6820428D13
NM_172960.1	1,608	Adck5	aarF domain containing kinase 5
AK040457.1	1,501	Il27ra	interleukin 27 receptor, alpha
NM_008595.1	1,446	Mfng	manic fringe homolog (Drosophila)
NM_033325.1	1,445	Loxl2	lysyl oxidase-like 2
NM_145526.1	1,425	P2rx3	purinergic receptor P2X, ligand-gated ion channel, 3
NM_008183.2	1,419	Gstm2	glutathione S-transferase, mu 2
NM_025695.2	1,414	Smc6l1	SMC6 structural maintenance of chromosomes 6-like 1 (yeast)
NM_009369.1	1,414	Tgfb1	transforming growth factor, beta induced
NM_025522.1	1,410	Dhrs7	dehydrogenase/reductase (SDR family) member 7
NM_007997.1	1,399	Fdxr	ferredoxin reductase
NM_207204.1	1,382	4930519N13Rik	RIKEN cDNA 4930519N13 gene
NM_007833.1	1,360	Dcn	decorin
NM_008877.2	1,342	Plg	plasminogen
NM_019966.1	1,331	Mlycd	malonyl-CoA decarboxylase
NM_175027.2	1,316	BC022692	cDNA sequence BC022692
NM_080553.1	1,309	Itpr3	inositol 1,4,5-triphosphate receptor 3
NM_010480.4	1,308	Hspca	heat shock protein 1, alpha
NM_029823.1	1,273	6530401D17Rik	RIKEN cDNA 6530401D17 gene
NM_008144.3	1,273	Bscl2	Bernardinelli-Seip congenital lipodystrophy 2 homolog (human)
NM_198031.1	1,266	Tubgcp3	tubulin, gamma complex associated protein 3
NM_008810.2	1,249	Pdha1	pyruvate dehydrogenase E1 alpha 1
NM_008666.1	1,246	Myt1l	myelin transcription factor 1-like
NM_173427.1	1,240	B230308G19Rik	RIKEN cDNA B230308G19 gene
NM_178794.2	1,234	U2af1-rs2	U2 small nuclear ribonucleoprotein auxiliary factor (U2AF) 1, related sequence 2
NM_146034.1	1,234	Mgea6	meningioma expressed antigen 6 (coiled-coil proline-rich)
NM_019552.1	1,229	Abcb10	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 10
NM_178915.2	1,221	Al839735	expressed sequence Al839735
NM_008243.2	1,215	Mst1	macrophage stimulating 1 (hepatocyte growth factor-like)
NM_145482.1	1,175	ORF21	open reading frame 21
NM_025936.1	1,173	Rars	arginyl-tRNA synthetase
NM_028262.1	1,168	D12Ert771e	DNA segment, Chr 12, ERATO Doi 771, expressed

Table 1. cont.

UPREGULATED:			
RefSeq_NM	Wnt_AvsB	Gene_Symbol	Gene_Name
NM_031174.2	1,164	Dscam	Down syndrome cell adhesion molecule
NM_023304.1	1,149	Fgf22	fibroblast growth factor 22
NM_025932.1	1,139	Syap1	synapse associated protein 1
NM_013778.1	1,130	Akr1c13;Akr1c12	aldo-keto reductase family 1, member C13;aldo-keto reductase family 1, member C12
NM_013819.1	1,129	H2-M3	histocompatibility 2, M region locus 3
NM_007407.2	1,126	Adcyap1r1	adenylate cyclase activating polypeptide 1 receptor 1
NM_021273.2	1,122	Ckb	creatine kinase, brain
NM_008033.2	1,119	Fnta	farnesyltransferase, CAAX box, alpha
NM_009529.1	1,115	Xmr	Xlr-related, meiosis regulated
NM_207269.1	1,111	D330050I23Rik	RIKEN cDNA D330050I23 gene
NM_010752.1	1,108	Mad1l1	mitotic arrest deficient 1-like 1
NM_028089.1	1,091	Cyp2c55	cytochrome P450, family 2, subfamily c, polypeptide 55
NM_133224.1	1,090	Atp13a	ATPase type 13A
NM_025656.1	1,089	Sip1	survivor of motor neuron protein interacting protein 1
NM_028002.1	1,088	2310069P03Rik	RIKEN cDNA 2310069P03 gene
NM_010724.1	1,086	Psmb8	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type 8
NM_028131.1	1,081	2610510J17Rik	RIKEN cDNA 2610510J17 gene
NM_009239.1	1,080	Sp4	trans-acting transcription factor 4
NM_025437.2	1,077	Eif1ay	eukaryotic translation initiation factor 1A, Y-linked
NM_183294.1	1,072	Cdkl1	cyclin-dependent kinase-like 1 (CDC2-related kinase)
NM_013779.1	1,070	Magel2	melanoma antigen, family L, 2
NM_021556.2	1,063	Mrps30	mitochondrial ribosomal protein S30
NM_207210.1	1,059	Dyrk4	dual-specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation regulated kinase 4
NM_146035.1	1,057	Mgat2	mannoside acetylglucosaminyltransferase 2
NM_144844.1	1,049	Pcca	propionyl-Coenzyme A carboxylase, alpha polypeptide
NM_178389.2	1,045	Gale	galactose-4-epimerase, UDP
NM_012035.1	1,041	Trpc7	transient receptor potential cation channel, subfamily C, member 7
NM_176953.2	1,034	Lig4	ligase IV, DNA, ATP-dependent
NM_008183.2	1,033	Gstm2	glutathione S-transferase, mu 2
NM_178242.2	1,032	Zfp469	zinc finger protein 469
NM_009933.1	1,030	Col6a1	procollagen, type VI, alpha 1
NM_010068.1	1,030	Dnmt3b	DNA methyltransferase 3B
NM_028270.2	1,027	Aldh1b1	aldehyde dehydrogenase 1 family, member B1
NM_172783.1	1,022	Phka2	phosphorylase kinase alpha 2
NM_008590.1	1,020	Mest	mesoderm specific transcript
NM_013761.2	1,017	Srr	serine racemase
NM_029541.1	1,017	6530401D17Rik	RIKEN cDNA 6530401D17 gene
NM_025486.1	1,012	1700006C06Rik	RIKEN cDNA 1700006C06 gene
NM_130864.2	1,012	Acaa1	acetyl-Coenzyme A acyltransferase 1
DOWNREGULATED:			
RefSeq_NM	Wnt_AvsB	Gene_Symbol	Gene_Name
NM_019932.1	-3,616	Cxcl4	chemokine (C-X-C motif) ligand 4
NM_010703.2	-3,395	Lef1	lymphoid enhancer binding factor 1
NM_011702.1	-2,102	Vip	vasoactive intestinal polypeptide
NM_010685.2	-2,085	Lamp2	lysosomal membrane glycoprotein 2
NM_011333.1	-1,843	Ccl2	chemokine (C-C motif) ligand 2
AK027922.1	-1,770	Gsto1	glutathione S-transferase omega 1

Table 1. cont.

DOWNREGULATED:			
RefSeq_NM	Wnt_AvsB	Gene_Symbol	Gene_Name
NM_010515.1	−1,748	Igf2r	insulin-like growth factor 2 receptor
NM_007635.2	−1,679	Ccng2	cyclin G2
NM_013492.1	−1,634	Clu	clusterin
NM_027285.1	−1,585	1700029I01Rik	RIKEN cDNA 1700029I01 gene
NM_177708.3	−1,583	Rtn4rl1	
NM_016867.1	−1,571	Semcap2	semaF cytoplasmic domain associated protein 2
NM_009150.2	−1,552	Selenbp2;Selenbp1	selenium binding protein 2;selenium binding protein 1
NM_177820.2	−1,484	9130218O11Rik	RIKEN cDNA 9130218O11 gene
NM_009726.2	−1,423	Atp7a	ATPase, Cu++ transporting, alpha polypeptide
NM_026416.2	−1,393	S100a16	S100 calcium binding protein A16
NM_023422.1	−1,390	Hist1h2bc	histone 1, H2bc
NM_009760.2	−1,378	Bnip3	BCL2/adenovirus E1B 19kDa-interacting protein 1, NIP3
NM_030037.1	−1,334	Mospd3	motile sperm domain containing 3
NM_010149.2	−1,323	Epor	erythropoietin receptor
NM_172296.1	−1,305	Dmrta2	doublesex and mab-3 related transcription factor like family A2
AK076923.1	−1,305	Ppm1b	protein phosphatase 1B, magnesium dependent, beta isoform
NM_026030.1	−1,298	Eif2s2	eukaryotic translation initiation factor 2, subunit 2 (beta)
NM_194268.2	−1,294	Onecut2	one cut domain, family member 2
NM_008926.2	−1,293	Prkg2	protein kinase, cGMP-dependent, type II
NM_026565.2	−1,291	9430083G14Rik	RIKEN cDNA 9430083G14 gene
NM_025949.1	−1,279	Rps6ka6	ribosomal protein S6 kinase polypeptide 6
NM_009242.1	−1,264	Sparc	secreted acidic cysteine rich glycoprotein
NM_178405.2	−1,256	Atp1a2	ATPase, Na+/K+ transporting, alpha 2 polypeptide
NM_007874.2	−1,237	Dp1	deleted in polyposis 1
NM_026793.1	−1,236	Myct1	myc target 1
NM_177603.1	−1,228	Frat2	frequently rearranged in advanced T-cell lymphomas 2
NM_025836.1	−1,224	M6prbp1	mannose-6-phosphate receptor binding protein 1
NM_028535.1	−1,224	1700049E17Rik	RIKEN cDNA 1700049E17 gene
NM_026358.1	−1,221	4930583H14Rik	RIKEN cDNA 4930583H14 gene
NM_172132.1	−1,218	Jmjd2b	jumonji domain containing 2B
AK005820.1	−1,210	Rab15	RAB, member of RAS oncogene family-like 5
AK049314.1	−1,193	Trim27	tripartite motif protein 27
NM_017367.2	−1,188	Ccni	cyclin I
NM_009814.1	−1,180	Casq2	calsequestrin 2
NM_009101.1	−1,174	Rras	Harvey rat sarcoma oncogene, subgroup R
AK003039.1	−1,174	Gltp	glycolipid transfer protein
NM_008467.2	−1,172	Kpna4	karyopherin (importin) alpha 4
BC038145.1	−1,172	BC002199	cDNA sequence BC002199
NM_133780.2	−1,168	Tpr	translocated promoter region
NM_177798.3	−1,157	Frs2	fibroblast growth factor receptor substrate 2
NM_008906.2	−1,153	Ppgb	protective protein for beta-galactosidase
NM_015818.1	−1,152	Hs6st1	heparan sulfate 6-O-sulfotransferase 1
NM_009113.2	−1,152	S100a13	S100 calcium binding protein A13
NM_009344.1	−1,148	Phlda1	pleckstrin homology-like domain, family A, member 1
NM_019675.2	−1,148	Stmn4	stathmin-like 4
NM_146141.1	−1,147	1110013G13Rik	RIKEN cDNA 1110013G13 gene
NM_009140.1	−1,146	Cxcl2	chemokine (C-X-C motif) ligand 2

Table 1. cont.

DOWNREGULATED:			
RefSeq_NM	Wnt_AvsB	Gene_Symbol	Gene_Name
NM_173788.2	–1,145	Npr2	natriuretic peptide receptor 2
NM_021274.1	–1,144	Cxcl10	chemokine (C-X-C motif) ligand 10
AK052456.1	–1,142	D430026P16Rik	RIKEN cDNA D430026P16 gene
NM_153399.1	–1,140	Syne1	synaptic nuclear envelope 1
NM_011756.3	–1,136	Zfp36	zinc finger protein 36
AK083556.1	–1,136	Fst	follicle-stimulating hormone receptor
NM_026033.1	–1,122	Odag	ocular development associated gene
NM_031997.2	–1,121	Tmem2	transmembrane protein 2
NM_178772.2	–1,117	B230106I24Rik	RIKEN cDNA B230106I24 gene
NM_011353.1	–1,112	Serf1	small EDRK-rich factor 1
NM_021398.1	–1,110	Slc43a3	solute carrier family 43, member 3
NM_027482.1	–1,095	5730508B09Rik	RIKEN cDNA 5730508B09 gene
NM_133777.1	–1,087	Ube2s	ubiquitin-conjugating enzyme E2S
NM_012057.1	–1,083	Irf5	interferon regulatory factor 5
NM_013660.1	–1,080	Sema4d	sema domain, immunoglobulin domain (Ig), (semaphorin) 4D
NM_146260.1	–1,080	Tmie	transmembrane inner ear
NM_153068.1	–1,075	Ehd2	EH-domain containing 2
NM_138584.1	–1,074	Spg21	spastic paraplegia 21 homolog (human)
NM_011295.2	–1,073	Rps12	ribosomal protein S12
NM_030696.2	–1,071	Slc16a3	solute carrier family 16 (monocarboxylic acid transporters), member 3
NM_130903.2	–1,068	Cd209c	CD209c antigen
NM_020586.1	–1,068	5031400M07Rik	RIKEN cDNA 5031400M07 gene
NM_031997.2	–1,067	Tmem2	transmembrane protein 2
NM_010789.1	–1,065	Meis1	myeloid ecotropic viral integration site 1
NM_011498.2	–1,065	Bhlhb2	basic helix-loop-helix domain containing, class B2
NM_025290.2	–1,063	Tsga2	testis specific gene A2
NM_139144.2	–1,063	Ogt	O-linked N-acetylglucosamine (GlcNAc) transferase (UDP-N-acetylglucosamine:polypeptide-N-acetylglucosaminyl transferase)
NM_009895.2	–1,059	Cish	cytokine inducible SH2-containing protein
NM_011171.1	–1,057	Procr	protein C receptor, endothelial
NM_019880.2	–1,056	Mtch1	mitochondrial carrier homolog 1 (C. elegans)
NM_010658.2	–1,056	Mafb	v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene family, protein B (avian)
NM_011046.1	–1,054	Furin	furin (paired basic amino acid cleaving enzyme)
NM_011252.2	–1,053	RbmX	RNA binding motif protein, X chromosome
NM_007585.2	–1,047	Anxa2	annexin A2
NM_025348.1	–1,045	Ndufa3	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 3
BC028655.1	–1,044	Solt	SoxLZ/Sox6 leucine zipper binding protein in testis
NM_028279.1	–1,043	Naalad2	N-acetylated alpha-linked acidic dipeptidase 2
NM_018865.1	–1,040	Wisp1	WNT1 inducible signaling pathway protein 1
NM_178751.2	–1,038	A730041O15Rik	RIKEN cDNA A730041O15 gene
NM_029688.2	–1,037	Npn3	neoplastic progression 3
NM_013692.1	–1,031	Tieg1	TGF β inducible early growth response 1
NM_013525.1	–1,025	Gas5	growth arrest specific 5
NM_175395.2	–1,023	1700001A24Rik; 6330578E17Rik	RIKEN cDNA 1700001A24 gene;RIKEN cDNA 6330578E17 gene
NM_019704.1	–1,023	C78915	expressed sequence C78915
NM_010234.2	–1,022	Fos	FBJ osteosarcoma oncogene

Table 1. cont.

DOWNREGULATED:			
RefSeq_NM	Wnt_AvsB	Gene_Symbol	Gene_Name
NM_011594.2	–1,020	Timp2	tissue inhibitor of metalloproteinase 2
NM_198420.1	–1,019	D15Wsu169e	DNA segment, Chr 15, Wayne State University 169, expressed
NM_008662.1	–1,018	Myo6	myosin VI
AK033214.1	–1,018	Gfm	G elongation factor
NM_010885.2	–1,013	Ndufa2	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 2
NM_027287.1	–1,007	Dnajb4	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 4
NM_133942.1	–1,006	AA960558	expressed sequence AA960558
NM_007664.1	–1,005	Cdh2	cadherin 2
NM_027189.1	–1,004	Gemin7	gem (nuclear organelle) associated protein 7
NM_009627.1	–1,001	Adm	adrenomedullin

This Table represent a selection of annotated genes upregulated (red) and downregulated (green) by estradiol, sensitive to LEF-1 mutant. The list contains only those “annotated genes” with a log2R higher or lower than 1. **A** represent the control cell line (N2a-m-mock transfected). **B** represents the cell line transfected with *delta-56*-LEF-1. In the table **est**, represents treatment with estradiol; and **Wnt**, treatment with Wnt3a.

We labeled two genes (*plasminogen* and *LEF-1*) regulated by estradiol or by Wnt3a, both were subsequently validated at protein level.
doi:10.1371/journal.pone.0005153.t001

LEF-1 mutant background, such as Plasminogen, LEF-1, β -catenin and MMP-2, and second, a group of genes which initially responded to estradiol, either positively or negatively, and additionally showed an increased response in the Δ 56LEF-1 cells, such as N-Cadherin, E-Cadherin and Cyclin D2. Indeed, the CyclinD2 promoter is clearly regulated by the estrogen receptor as well as by TCFs, although its responsiveness to Wnt proteins has also been assessed [36,38]. Our data indicate that in neurons, this gene may be regulated by both elements, at least in part *via* β -catenin/LEF-1.

Taken together, these data demonstrate the existence of a new pathway controlled by estradiol, at least in neurons. Our data show that this pathway contains some elements that may belong to the canonical Wnt-pathway. Indeed some reports indicate that estradiol may control the response of the Wnt pathway as an important part of its neuroprotective role. This neuroprotective response is mediated by increase of Wnt3a and inhibition of Dkk1 elevation, triggered after cerebral ischemia [43]. More work is now required to identify whether a similar mechanism is specific for certain types of brain insults or represents a more general mechanism. The analysis of our arrays (**Table 1**) supports the hypothesis that only part of the estradiol response sensitive to LEF-1, is similar to Wnt3a response sensitive to LEF-1. This open the possibility that in addition of collaborate with the Wnt response, estradiol may regulated a pool genes (β -catenin/LEF-1- directed), independently of Wnt status.

“Neuroprotective role” of estradiol and GSK3 inhibition

A complementary and important aspect of our data is that estradiol modulates the kinase activity of GSK3 irrespective of the neuronal source, and consequently the stabilization of β -catenin is an important event in these so called “non-genomic actions”. When considering the role of GSK3 and β -catenin in neurodegeneration [44], such as in relation to Alzheimer’s disease or ischemia, some of the functional effects of estradiol may, at least in part, represent an important physiological control of this kinase [15]. We have to remember that in model systems of β -amyloid-mediated toxicity, similar concentrations of estradiol may protect neurons [15,45,46].

Estrogens play an important role in normal brain development [47,48]. In addition, this hormone appears to exert a more general neuroprotective effect such as in mouse models of Parkinson’s disease [49–53] or after brain ischemia [54–58]. In some ischemia models the estradiol-mediated GSK3 response, appears to be JNK-Dkk1-dependent [43], and we cannot discard this possibility in our neuronal system. However, our data indicate that the estradiol-mediated inhibition of GSK3 is PI3K-Akt dependent (O. Varea et al., unpublished data). It will be very important to determine whether the response that we observed is specific to “immature neurons” or whether it represents a more general mechanism.

Materials and Methods

Primary Cortical neurons and Neuroblastoma N2a-m

Mice were treated following the guidelines of Council of Europe Convention ETS123, recently revised as indicated in the Directive 86/609/EEC. In addition all protocols were approved by the institutional animal care and use committee. Cortical neurons were obtained from E18 mouse embryos after isolating the cortex in Ca^{2+} - and Mg^{2+} -free Hanks Buffer Salt Solution (HBSS 1 \times , GIBCO). Once 8–10 embryonic cortices were obtained, they were finely cited, washed twice in HBSS 1 \times buffer, and incubated in 0.25% trypsin (GIBCO) and 1 mg/ml DNase (Roche) for 15 min at 37°C. Trypsin and DNase were then eliminated by washing three times, with HBSS 1 \times , and the cut tissue was then triturated using a siliconized pipette. The cells were counted and plated in a poly-lysine coated (1 mg/ml, Sigma) 60 mm dish containing plating medium (MEM, 20% Glucose, horse serum and antibiotics). After 3 hours plating, the medium was changed to phenol red-free Neurobasal medium supplemented with B-B27 (GIBCO) and the neurons were maintained under these conditions for 2 days. Murine neuroblastoma N2a-m cells were grown at 37°C in 7% CO_2 , in DMEM supplemented with 10% fetal calf serum (GIBCO) and 2 mM glutamine.

Cell treatments. One day before treatment, the medium was changed to serum and phenol red free-medium. The compounds used for treatments were: 17- β -estradiol (stored in ethanol at a concentration of 1 mM), ICI 182780 (Tocris, stored in dimethyl

A

gene ID	log2R		Gene_Symbol
	est_AvsB	wnt_AvsB	
mCG16690.2	2,039	1,342	Plg
mCG141417	0,285	0,218	Tcf3
mCG21251.1	0,379	0,573	Ccnd1
mCG129094.1	0,145	0,118	Gsk3b
mCG1625.1	-0,060	0,183	Myc
mCG129638.1	0,172	-0,163	Nmyc1
mCG10208.2	-2,642	-3,395	Lef1

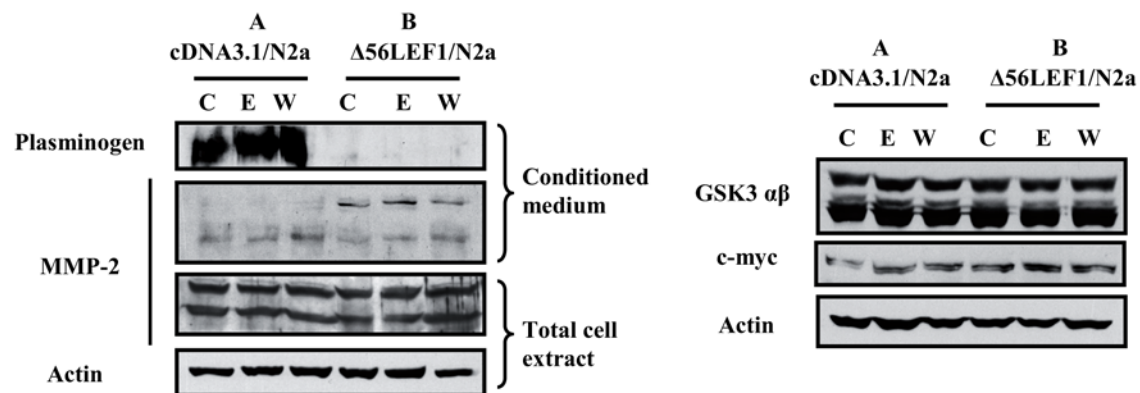
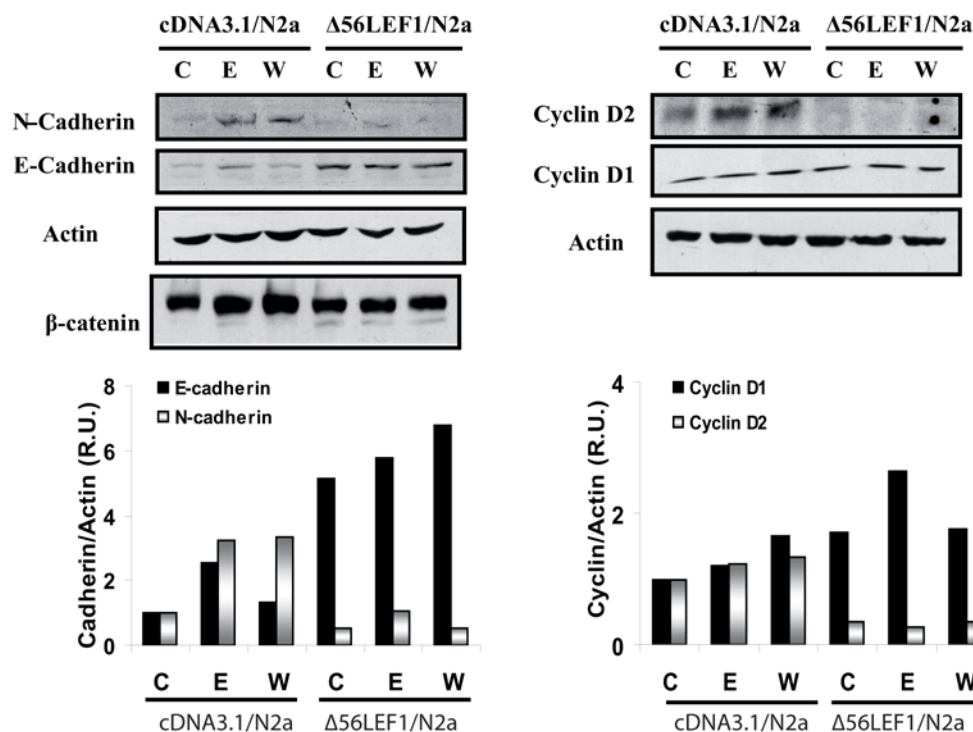
**B**

Figure 9. Gene expression of cDNA/N2a-m and Δ 56LEF-1/N2a-m cells after exposure to estradiol. (A)- Gene expression profile in cDNA/N2a-m and Δ 56LEF-1/N2a-m stables cell lines. The upper panel reflects the gene induction of some selected genes, in microarray analysis of RNA collected after a 45 min exposure to estradiol or Wnt3a to detect the early response. Data is expressed as $\log_2 R$ from cDNA/N2a-m cells, that we denoted as **group A**, and Δ 56LEF-1/N2a-m cells, that we denoted as **group B**. The effect of the treatment was compared between the two stable cell lines (**A vs B**) (see “Table 1” for a more complete list of the annotated genes). As seen, in the panel we selected some “putative Wnt-regulated genes”, such as *Tcf3*, *Ccnd1* (cyclin D1), *GSK3b*, *Myc* and *LEF-1*, to give some examples of the results in our arrays. We detected changes at the protein level only in *Plg*, although there were several genes whose expression varied. For example, the levels of plasminogen RNA were much higher in **group B** than **group A** (ratio $\text{AvsB} \geq 1$), and the expression of LEF-1 was higher in Δ 56LEF-1 due to the mutant expression (ratio $\text{AvsB} \leq -1$). The western blots below are verifications of these differences at the protein level. Among other proteins that did not change between the groups of cells were GSK3 β or myc (see western blots on the right). MMP-2 was tested although it did not display a change in its RNA levels and there was no difference in the total cell extracts. Interestingly, when conditioned medium was prepared, more pro-active MMP-2 (and less active protein) was seen in Δ 56LEF-1 cells. [Gene_Symbol: *Plg* (plasminogen), *Tcf3*, *Ccnd1* (cyclin D1), *GSK3b*, *Myc* and *LEF1*]. **(B)-** Estradiol induction of N-cadherin and cyclin D2 may be affected by expression of the Δ 56LEF-1 protein. Total cell extracts from cDNA/N2a-m cells (**group A**) and Δ 56LEF-1/N2a-m cells (**group B**) were collected 24 h after estradiol or Wnt3a treatment to analyze several known Wnt or estrogen target genes. As seen in western blots, estradiol upregulated E-cadherin, N-cadherin and cyclin D2 expression in group A cells. N-cadherin and cyclin D2 were also upregulated by Wnt in **group A** cells. In contrast, E-cadherin expression was not Wnt responsive. The regulatory effects of estradiol on E-cadherin, N-cadherin and cyclin D2 expression were lost when Δ 56LEF-1 is expressed, as seen in group B cells. In the case of E-cadherin, the loss of functional LEF-1, which acts as a known gene repressor, implies higher protein levels even without stimulation. In contrast, levels of actin or cyclin D1 remained unchanged.

doi:10.1371/journal.pone.0005153.g009

sulfoxide -DMSO- at 2 mM), Wnt3a recombinant protein (R&D systems, dissolved in PBS-BSA 0.1% and stored at 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), and the estrogen receptor agonists, 4,4',4''-(propyl-[(1)H]-pyrazole-1,3,5-triyl) trisphenol (PPT, α -selective) and 2,3-bis (4-hydroxyphenyl) propionitrile (DPN (β -selective) agonists, both dissolved in ethanol. Different concentrations of these compounds were used as indicated for each experiment and the controls received the vehicle of each compound alone, ethanol in the case of estradiol, DMSO for ICI 182780 and PBS-BSA 0.1% as control for Wnt3a. The final concentration of ICI 182780 used was depending on the concentration of estradiol, in a ICI/estradiol ratio of 100 times.

Western Blotting and Antibodies

After two washes with PBS, cell extracts were prepared in lysis buffer containing 200 mM Hepes pH 7.4, 100 mM NaCl, 100 mM NaF, 1 mM Na_3VO_4 , 5 mM EDTA, 1% Triton and a protease inhibitor cocktail (Roche). The cells were left for 30 min on ice in this lysis buffer and then collected with a cell scraper. After adding loading buffer, the samples were boiled for 10 min and resolved by Tris/Glycine SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis, and the proteins were then transferred to a nitrocellulose membrane (Amersham) in the presence of 20% methanol and 0.1% SDS. Non-specific signals were blocked by incubating the membrane in PBS-Tween-20 (PBT) and 5% milk for 2 h. The antibodies used to probe the membranes were raised against: Ct ER α 1:800 (MC-20, Santa Cruz), ER β 1:1000 (H-150, Santa Cruz), GSK3 α/β 1:1000 (Cell signalling), GSKPser^{9, 21} 1:1000 (Cell Signalling), β -catenin 1:800 (Transduction Labs), non-phospho β -catenin 1:800 (Upstate), actin 1:2000 (Sigma), LEF-1 HMG box 1:800 (Sigma), cyclin D1 1:1000 (Santa Cruz), cyclin D2 1:1000 (MBL), N cadherin 1:1000 (Sigma), E cadherin 1:800 (Santa Cruz), MMP2 1:200 (Santa Cruz), nucleolin 1:1000 (Santa Cruz), beta-galactosidase (ICN Biomed-Cappel), β -III tubulin (Chemicon). These antibodies were then detected with horseradish peroxidase conjugated secondary antibodies (Amersham) used at a dilution of 1:5000.

Immunocytochemistry

To study the localization of proteins by immunocytochemistry, we fixed cells plated at low density with 4% paraformaldehyde for 20 min at RT. After 3 washes for 10 min in PBS, fixed-cells were incubated with 50 mM NH_4Cl and then blocked and permeabilized for 30 min with 1% fetal calf serum and 0.1% Triton-X-100 in PBS. The cells were incubated with the primary antibodies for 2 h at RT and after 3 washes with blocking solution, the secondary Alexa fluor-488 or 594 antibodies were added (1:1000, Molecular Probes). The primary antibodies used were raised against

β -catenin (1:400, Transduction Labs) or ER α (1:500, MC-20, Santa Cruz). To visualize the distribution of polymerized actin, fixed cells were stained with phalloidin conjugated to Alexa 488 or 594, as indicated in each experiment (1:100, Molecular Probes). Coverslips were mounted with Fluoromount G (Southern Biotechnology Associates, Inc) and photographs were taken on a confocal microscope (LSM 510 META, Zeiss).

Plasmids and Transient expression in N2a-m cells

The plasmids used for transient expression were: pTOPFlash (Upstate), containing three copies of the consensus sequence recognized by the TCF/LEF transcription factors (CCTTTGATC) and with the c-Fos promoter driving the expression of luciferase gene; pFOPFlash (Upstate) that contains three non-functional copies of the TCF/LEF binding site (CCTTTGGCC); and EGFP-N1 encodes an enhanced green-fluorescent protein used to quantify the efficiency of transfection when co-transfected with TOP/FOPFlash. N2a-m cells were transfected using LipofectAMINE 2000 (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. For transfection, 600,000 cells were plated in a 60 mm-culture dish with growth medium and the day before transfection, the medium was changed to DMEM without FCS or antibiotics. Co-transfections were performed with 2 μl LipofectAMINE (Invitrogen) and 1 μg of total-DNA (0.75 μg TOP/FOP plus 0.25 μg EGFP-N1). After transfection, the medium was changed to DMEM without phenol red or FCS, supplemented with an antibiotic cocktail. Treatments were started 48 h after transfection to coincide with the maximum expression levels of the co-transfected proteins.

Other plasmids used for transfection were: empty pcDNA3 as an internal control; Δ 45 β -catenin, a deleted form of β -catenin lacking the N-terminal (kindly provided by Dr. R. Moon); and LEF-1 Δ 56 (kindly provided by Dr. R. Grosschedl) that expresses a form of LEF-1 that is unable to interact with β -catenin.

Primary Cortical Neuron Nucleofection

The TOPFlash plasmid was introduced into cortical neurons by nucleofection (Basic Nucleofector Kit for Primary Mammalian Neural cells, Amaxa Bioscience) according to the manufacturer instructions. A total of 3 μg TOPFlash plus 1 μg GFP was introduced into 4×10^6 cells, and both luciferase activity and the efficiency of nucleofection were analyzed after 2 days in culture.

Assay of luciferase activity

After treatment of the TOPFlash transfected N2a-m cells, they were incubated in 60 mm plate with 1 ml of TEN buffer (40 mM

Tris-HCl pH 7.5, 10 mM EDTA, 150 mM NaCl) for 15 min at RT to detach the cells from the dish. Once the cells had been collected and pelleted, they were resuspended in 100 μ l of lysis-buffer (100 mM Potassium Phosphate buffer pH 7.8, 1 mM DTT, 0.5% Triton) and incubated on ice for 30 min. The lysate was then centrifuged at 4°C, 5 min to eliminate aggregates and the supernatant was transferred to a fresh tube. A fraction of this supernatant was resolved by electrophoresis to check the cellular mass and the amount of protein was quantified. The rest of the cell extract was used to measure the luciferase activity in 200 μ l of luciferase buffer (25 mM Glycyl-glycine, 15 mM MgSO₄, 5 mM ATP, 1 mM DTT, 100 μ g/ml BSA) mixed with 20 μ l of the cell extract. The luciferine reaction substrate (Promega) was used at a concentration of 1 mM (dissolved in sterile water), and we determined the quantity of luciferase expressed in the cells by measuring the reaction at 560 nm with a luminometer (Monolight® 2010, Analytical Luminescence Laboratory). The values obtained correspond to the mean and standard deviation of three sets of independent experiments. To analyze the induction of β -catenin co-activator function, the values were normalized to controls (corresponding to the ratio transfected/non treated cells).

Immunoprecipitation

Immunoprecipitation assays we carried out on a confluent culture dish of N2a-m cells that were collected in 0.5 ml of immunoprecipitation buffer A (1% Triton X-100, 150 mM NaCl, 10 mM Tris pH 7.4, 1 mM EDTA pH 8, 1 mM EGTA pH 8, 0.2 mM sodium-*ortho*-vanadate, 0.2 mM PMSF, 0.5% NP-40). After incubation on ice for 30 min, the lysate was centrifuged (16000 \times g at 4°C, 15 min) to eliminate possible aggregates. The supernatant (100 μ l of total native lysate) was incubated in the following buffer: 2% Triton X-100, 20 mM Tris pH 7.4, 2 mM EDTA pH 8, 2 mM EGTA pH 8, 0.4 mM sodium *ortho*-vanadate, 0.4 mM PMSF, 1% NP-40) in the presence of 5 μ g of anti-ER α antibody in a total volume of 500 μ l. The mixture was incubated for 1 h at 4°C and subsequently, 10 μ l of Protein A-Agarose solution (Sigma) was added and incubated at 4°C for 30 min with agitation. The agarose beads were recovered by centrifuging at 16000 \times g for 4 min at 4°C, and the pellet was washed three times with buffer A and centrifuged (16000 \times g at 4°C). Finally, the pellet was resuspended in 30 μ l of 2 \times electrophoresis sample buffer (250 mM Tris pH 6.8, 4% SDS, 10% glycerol, 0.006% bromophenol blue, 2% β -mercaptoethanol), boiled for 10 min and loaded onto an SDS-PAGE gel to be analyzed by western blotting.

Purification of cortical nuclei

After the dissection of the cortex from 12–16 E18 embryos, the tissue was homogenized in buffer A (0.32 M sucrose, 10 mM Tris pH 7.4, 3 mM MgCl₂ supplemented with 0.1% Triton-X-100, protease inhibitors, DTT and PMSF). The homogenate was centrifuged at 2500 rpm for 10 min at 4°C, the supernatant was discarded and the pellet was resuspended in buffer A without Triton, and centrifuged in the same conditions. The pellet obtained was resuspended in buffer B (the same as buffer A, but containing 1.9 M sucrose instead of 0.32 M) and homogenized again. The extract was carefully loaded over buffer C (buffer A, but with 2 M sucrose) and spun at 12000 rpm for 60 min at 4°C. The final pellet of the nuclei was resuspended in 50 μ l of buffer A, 150 μ l of protein extraction buffer (20 mM Tris pH 7.4, 400 mM NaCl, 0.5 mM EDTA pH 8, 0.5 mM EGTA pH 8, 2 mM MgCl₂) was added and the mix was incubated on ice for 30 min. To finally obtain the soluble fraction of nuclear proteins, the extract was centrifuged at 35000 rpm for 30 min at 4°C and the

protein concentration in the extracts was measure using the Lowry reaction.

Electrophoretic Mobility Shift Assays (EMSA)

To obtain nuclear extracts of N2a-m or cortical neurons, cells were grown in serum free-DMEM, without phenol red, to 80% confluence. After washing twice with PBS, 400 μ l of EMSA buffer A was added to each P100 dish (10 mM Tris pH 7.5, 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 1 mM DTT, PMSF, 1 μ M Na₃VO₄ and protease inhibitor cocktail). Once two confluent P100 mm dishes were collected in a fresh tube (8 P60 mm in the case of cortical primary neurons), cells were incubated for 15 min on ice and then 40 μ l of 10% NP-40 was added and vortexed for 20 sec. The supernatant was centrifuged for 30 sec at 15000 rpm to obtain the cytoplasm fraction. Once dry-resuspended the pellet containing the nuclei, 50 μ l of EMSA buffer B (20 mM Tris pH 7.5, 400 mM NaCl, 0.5 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 2 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF, 1 μ M Na₃VO₄ and protease inhibitor cocktail) was added at 4°C with vigorous shaking for 15 min. The samples were then centrifuged for 30 sec at 15000 rpm and the supernatant recovered as the nuclear extract. The EMSA assay was performed as described previously [59]. Protein-primer binding was carried out with 20 μ g of nuclear proteins during 30 min at RT and a similar amount of each primer (50.000 cpm/ μ l annealed primer) was added to the reaction at a concentration of 1 mg/ml (sequence forward: 5'-GTCGCCCTTTGATCTTACC-3', reverse: 5'-GTCGGGTAA-GATCAAAGGG-3', synthetic oligonucleotides from Invitrogen). When antibodies were used in the EMSA assays, 2 μ g of antibody against TCF-1-X, TCF-3-X and LEF-1-X (from Santa Cruz) and 1 μ g of antibody against β -catenin (Transduction Labs) or 0.8 μ g of antibody against ER α (MC-20, Santa Cruz) was added 20 min after the binding reaction had terminated. Competition experiments were performed to recognize the specific bands corresponding to the TCF/LEF-1-DNA complex using TCF/LEF containing the mutated sequence (sequence forward: 5'-GTCGCCCTTTGATCTTACC-3', reverse: 5'-GTCGGGTAAAGGCCAAAGGG-3') and unlabelled-wild type TCF/LEF sequence at different final concentrations (20 ng and 100 ng). In all cases, the binding reaction was carried out at a final concentration of 60–65 mM KCl and in the presence of poly dIdC (1 mg/ml) and CHAPS (20%). The results of the binding reaction were analyzed in 4.5% acrylamide/bisacrylamide gels run at constant 130 V and dried (80°C, 1 h).

Total RNA isolation and RT-PCR quantification

Total RNA was isolated from N2a-m cells from a confluent P100 mm dish or from 3 P60 mm dishes in the case of cortical neurons. An additional set of RNA was obtained from N2a-m stable-transfected with pcDNA3-LEF-1 56 or with empty-pcDNA3, either untreated or exposed to estradiol or Wnt3a. RNA was obtained using TRIzol (GIBCO) and it was finally resuspended in sterile-DEPC treated water. The RNA concentration was determined by spectrophotometry at 260 nm, and its integrity was checked using a Bioanalyzer Chip (Agilent). First strand cDNA synthesis was performed on 2 μ g of RNA and using the reverse primer as the priming site, hybridized at 37–40°C during 5 min before the remaining reaction components were added: MMLV Reverse-Transcriptase, 2.5 mM DTT, and RT-Buffer (GIBCO) with RNAsin and 10 mM dNTPs. Elongation was performed at 37°C (optimal temperature for the RT enzyme) and the reaction was finally heated to 94°C (5 min) to inactivate the RT enzyme. RT-PCR amplification was performed to analyze cyclin D1, c-myc, actin, β -galactosidase, actin and GADPH expression using the Master SYBR Green I mix (Roche) with 2 mM MgCl₂ in a lightcycler instrument (Roche Molecular Biochemicals). PCR was performed under optimal

conditions for each primer pair. The oligonucleotide sequences and PCR conditions used were as follows: **actin**: 94°C-15 s, 57°C-10 s, 72°C-20 s (forward: 5'-TGTTTGAGACCTTCAACACC-3'; reverse: 5'-TAGGAGCCAGAGCAGTAATC-3'; 600 bp), **cyclin D1**: 94°C-15 s, 55°C-10 s, 72°C-20 s (forward: 5'-CACAAAGC-CACCTTCTTTCCA-3'; reverse: 5'-GACCAGCCTCTTCCTC-CAC-3'; 164 bp), **β -galactosidase**: 94°C-15 s, 64°C-5 s, 72°C-15 s (forward: 5'-ATCCTCTGCATGGTCAGGTC-3'; reverse: 5'-CGTGGCCTGATTTCATCC-3'; 315 bp).

Transgenic mice

The transgenic mice containing the lacZ gene under the control of three consensus TCF/LEF-binding motifs upstream of the c-fos promoter have been described previously [21] (strain Tg(Fos-LacZ)34Efu/J, JAX[®]Mice, The Jackson Laboratory). The genotype of the mice was checked using the following primers and PCR conditions: lacZ rose gene (forward: 5'-ATCCTCTG-CATGGTCAGGTC-3', reverse: 5'-CGTGGCCTGATT-CATTCC-3', 315 bp), endogenous gene (forward: 5'-CAAATGTTGCTTGTCTGGTG-3'; reverse: 5'-GTCAGTC-GAGTGCACAGTTT-3', 210 bp). The mouse colony was maintained in heterozygosis and it was necessary to check each embryo when used for primary neuronal cultures. Accordingly, a portion of the cortex was placed in a mixture containing "Dye Solution" (5 mM $K_4[Fe(CN)_6] \cdot 3H_2O$, 5 mM $K_3[Fe(CN)_6]$, 2 mM $MgCl_2$) and X-Gal (1 mg/ml).

Microarray analysis

Gene expression profiles were generated using Applied Biosystems Mouse Genome Survey Microarray. Total RNA pools were cleaned using the RNeasy kit from Qiagen (Hilden, Germany). Digoxigenin-UTP labeled cDNA probes were generated and linearly amplified from 1 μ g of each RNA pool using Applied Biosystems Chemiluminescent RT-IVT labeling Kit. Microarray hybridization, chemiluminescence detection, image acquisition and analysis were done according to Applied Biosystems protocols and the 1700 Chemiluminescent Microarray Analyzer.

Applied Biosystems Expression System software was used to extract Assay Signal, and Assay Signal to Noise ratio values from the microarray images. Bad spots flagged by the software were removed from the analysis. The Assay Signal of the represented genes was **log** transformed, loess-normalized (<http://www.bioconductor.org>) and further filtered by standard Expression Array System Signal to Noise threshold (S/N greater than 3 in at least one sample). The expression profiles of the two control populations (N2a-m stable-cell lines with or without Δ LEF-1) were compared with the corresponding population, treated with either estradiol or Wnt3a.

Supporting Information

Figure S1 N2a-m cells express both the ER α and ER β (lower caes beta) isoforms of the estrogen receptor and they respond to estradiol. Immunocytochemistry with anti-ER α and ER β identified a different cytoplasmic location for the two isoforms in both cell lines. While ER α presented was diffusely distributed throughout the cytosol and nucleus, and it accumulated in the

nucleus after the addition of estradiol (A–B). ER β distribution was more heterogeneous and it could be found in aggregates, diffusely distributed in the cytosol or in the nucleus (C–D). The addition of estradiol (B and D) increases the immunoreactivity against two receptors in the nucleus. Images were analyzed by confocal microscopy and western blotting confirmed the expression of both isoforms in total cell extracts from control cells.

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0005153.s001 (9.68 MB EPS)

Figure S2 Distribution of β -catenin after exposure of N2a-m cells to estradiol does not reveal the translocation of β -catenin to the nucleus. Cell fractions corresponding to the soluble, membrane and nuclear fractions were analyzed in control and estradiol treated cells. Neither 30 nor 60 min exposure to estradiol provoked the nuclear accumulation of β -catenin, statistically significant. In contrast, recruitment of β -catenin to the membrane fraction was more evident. We also checked the movement of ER α as a control of the assay, which clearly accumulated in the nuclear fraction (see Figure 8).

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0005153.s002 (2.36 MB EPS)

Figure S3 N2a-m cells are responsive to Wnt3a protein. (A)-N2a-m cells respond to Wnt3a (20 ng/ml) with the accumulation of β -catenin and with a maximal effect observed after 90–120 minutes. (B)- The transcriptional activity of β -catenin was analyzed with the TCF-luc reporter. Luciferase activity was calculated at different concentrations of Wnt3a protein, as indicated above, and Wnt3a produced a significant increase in β -catenin/TCF dependent transcription. Asterisk represents P value from Student's t-test: * ($P \leq 0.05$), when compared the two Wnt concentrations; and ** ($P \leq 0.01$) when compared with control.

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0005153.s003 (1.61 MB EPS)

Figure S4 Neither ER α nor TCF-3 antibodies modify the migration of nuclear protein extracts from N2a-m cells exposed to estradiol or Wnt3a. Nuclear protein extracts were obtained from control or estradiol/Wnt3a treated cells as indicated in each lane. The incubation with specific antibodies against ER α or TCF3 did not produce a higher molecular weight band that migrated more slowly than that previously identified as a TCF-DNA complex, nor did they prevent the formation of the complex.

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0005153.s004 (2.50 MB EPS)

Acknowledgments

We are grateful to Dr. Filip Lim, Dr. J. Diaz-Nido and Dr. I Anton for corrections to the manuscript and for thoughtful discussions. We also wish to thank Dr P. Medrano for providing us with antibodies and advice, and to Drs P. Bovolenta, R. Moom, R. Grosschedl and B. Vogelstein for providing us with some of the DNA constructs used in this project. We especially thank Drs. A. Nieto and Dr. C. Garcia for advice and help improving the EMSA technique.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: JJG PM LMGS FGW. Performed the experiments: OV AD PM. Analyzed the data: OV JJG AD LMGS FGW. Contributed reagents/materials/analysis tools: AD. Wrote the paper: FGW.

References

- Wang CN, Chi CW, Lin YL, Chen CF, Shiao YJ (2001) The neuroprotective effects of phytoestrogens on amyloid beta protein- induced toxicity are mediated by abrogating the activation of caspase cascade in rat cortical neurons. *J Biol Chem* (7): 5287–5295.
- Garcia-Segura LM, Azcoitia I, DonCarlos LL (2001) Neuroprotection by estradiol. *Prog Neurobiol* 63(1): 29–60.
- Wise P (2003) Estradiol exerts neuroprotective actions against ischemic brain injury: insights derived from animal models. *Endocrine* 21(1): 11–15.

4. McKenna NJ, O'Malley BW (2001) Nuclear receptors, coregulators, ligands, and selective receptor modulators: making sense of the patchwork quilt. *Ann N Y Acad Sci* 949: 3–5.
5. Beato M, Herrlich P, Schutz G (1995) Steroid hormone receptors: many actors in search of a plot. *Cell* 83(6): 851–857.
6. Kuiper GG, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA (1996) Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci USA* 93(12): 5925–5930.
7. Beato M, Klug J (2000) Steroid hormone receptors: an update. *Hum Reprod Update* 6(3): 225–236.
8. Singh M, Setalo G Jr, Guan X, Warren M, Toran-Allerand CD (1999) Estrogen-induced activation of mitogen-activated protein kinase in cerebral cortical explants: convergence of estrogen and neurotrophin signaling pathways. *J Neurosci* 19(4): 1179–1188.
9. Cordey M, Gundimeda U, Gopalakrishna R, Pike CJ (2003) Estrogen activates protein kinase C in neurons: role in neuroprotection. *J Neurochem* 84(6): 1340–1348.
10. Honda K, Sawada H, Kihara T, Urushitani M, Nakamizo T, et al. (2000) Phosphatidylinositol 3-kinase mediates neuroprotection by estrogen in cultured cortical neurons. *J Neurosci Res* 60(3): 321–327.
11. Mendez P, Azcoitia I, Garcia-Segura LM (2003) Estrogen receptor alpha forms estrogen-dependent multimolecular complexes with insulin-like growth factor receptor and phosphatidylinositol 3-kinase in the adult rat brain. *Brain Res Mol Brain Res* 112(1–2): 170–176.
12. Cardona-Gomez P, Perez M, Avila J, Garcia-Segura LM, Wandosell F (2004) Estradiol inhibits GSK3 and regulates interaction of estrogen receptors, GSK3, and beta-catenin in the hippocampus. *Mol Cell Neurosci* 25(3): 363–373.
13. Demay F, De Monti M, Tiffiche C, Vaillant C, Thieulant ML (2001) Steroid-independent activation of ER by GnRH in gonadotrope pituitary cells. *Endocrinology* 142(8): 3340–3347.
14. Pap M, Cooper GM (1998) Role of glycogen synthase kinase-3 in the phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt cell survival pathway. *J Biol Chem* 273(32): 19929–19932.
15. Xu H, Gouras GK, Greenfield JP, Vincent B, Naslund J, et al. (1998) Estrogen reduces neuronal generation of Alzheimer beta-amyloid peptides. *Nat Med* 4(4): 447–451.
16. Moon RT, Kohn AD, De Ferrari GV, Kaykas A (2004) WNT and beta-catenin signalling: diseases and therapies. *Nat Rev Genet* 5(9): 691–701.
17. Mulholland DJ, Dedhar S, Coetzee GA, Nelson CC (2005) Interaction of nuclear receptors with the Wnt/beta-catenin/Tcf signaling axis: Wnt you like to know? *Endocr Rev* 26(7): 898–915.
18. Arce L, Yokoyama NN, Waterman ML (2006) Diversity of LEF/TCF action in development and disease. *Oncogene* 25(57): 7492–7504.
19. Barolo S (2006) Transgenic Wnt/TCF pathway reporters: all you need is LeF? *Oncogene* 25(57): 7505–7511.
20. Bienz M (2005) beta-catenin: a pivot between cell adhesion and Wnt signalling. *Curr Biol* 15(2): R64–67.
21. DasGupta R, Fuchs E (1999) Multiple roles for activated LEF/TCF transcription complexes during hair follicle development and differentiation. *Development* 126(20): 4557–4568.
22. McGrew LL, Takemaru K, Bates R, Moon RT (1999) Direct regulation of the Xenopus engrailed-2 promoter by the Wnt signaling pathway, and a molecular screen for Wnt-responsive genes, confirm a role for Wnt signaling during neural patterning in Xenopus. *Mech Dev* 87(1–2): 21–32.
23. Hsu SC, Galceran J, Grosschedl R (1998) Modulation of transcriptional regulation by LEF-1 in response to Wnt-1 signaling and association with beta-catenin. *Mol Cell Biol* 18(8): 4807–4818.
24. Galceran J, Miyashita-Lin EM, Devaney E, Rubenstein JL, Grosschedl R (2000) Hippocampus development and generation of dentate gyrus granule cells is regulated by LEF1. *Development* 127(3): 469–482.
25. Tora L, White J, Brou C, Tasset D, Webster N, et al. (1989) The human estrogen receptor has two independent nonacidic transcriptional activation functions. *Cell* 59(3): 477–487.
26. Truss M, Beato M (1993) Steroid hormone receptors: interaction with deoxyribonucleic acid and transcription factors. *Endocr Rev* 14(4): 459–479.
27. Yu X, Rajala RV, McGinnis JF, Li F, Anderson RE, et al. (2004) Involvement of insulin/phosphoinositide 3-kinase/Akt signal pathway in 17 beta-estradiol-mediated neuroprotection. *J Biol Chem* 279(13): 13086–13094.
28. Kouzmenko AP, Takeyama K, Ito S, Furutani T, Sawatsubashi S, et al. (2004) Wnt/beta-catenin and estrogen signaling converge in vivo. *J Biol Chem* 279(39): 40255–40258.
29. Ray S, Xu F, Wang H, Das SK (2008) Cooperative Control via Lef-1/Tcf-3 and ER{alpha} for Uterine Gene Regulation by Estrogen. *Mol Endocrinol*. pp 1125–1140.
30. Li J, Wang CY (2008) TBL1-TBLR1 and beta-catenin recruit each other to Wnt target-gene promoter for transcription activation and oncogenesis. *Nat Cell Biol* 10(2): 160–169.
31. Flouriot G, Brand H, Denger S, Metivier R, Kos M, et al. (2000) Identification of a new isoform of the human estrogen receptor-alpha (hER-alpha) that is encoded by distinct transcripts and that is able to repress hER-alpha activation function 1. *Embo J* 19(17): 4688–4700.
32. Metivier R, Penot G, Carmouche RP, Hubner MR, Reid G, et al. (2004) Transcriptional complexes engaged by apo-estrogen receptor-alpha isoforms have divergent outcomes. *Embo J* 23(18): 3653–3666.
33. Gan XQ, Wang JY, Xi Y, Wu ZL, Li YP, et al. (2008) Nuclear Dvl, c-Jun, beta-catenin, and TCF form a complex leading to stabilization of beta-catenin-TCF interaction. *J Cell Biol* 180(6): 1087–1100.
34. Wu X, Tu X, Joeng KS, Hilton MJ, Williams DA, et al. (2008) Rac1 activation controls nuclear localization of beta-catenin during canonical Wnt signaling. *Cell* 133(2): 340–353.
35. Jamora C, DasGupta R, Kocieniewski P, Fuchs E (2003) Links between signal transduction, transcription and adhesion in epithelial bud development. *Nature* 422(6929): 317–322.
36. Shtutman M, Zhurinsky J, Simcha I, Albanese C, D'Amico M, et al. (1999) The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 96(10): 5522–5527.
37. Tetsu O, McCormick F (1999) Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature* 398(6726): 422–426.
38. Sansom OJ, Reed KR, van de Wetering M, Muncan V, Winton DJ, et al. (2005) Cyclin D1 is not an immediate target of beta-catenin following APC loss in the intestine. *J Biol Chem* 280(31): 28463–28467.
39. He TC, Sparks AB, Rago C, Hermeking H, Zawel L, et al. (1998) Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science* 281(5382): 1509–1512.
40. Hovanes K, Li TW, Munguia JE, Truong T, Milovanovic T, et al. (2001) Beta-catenin-sensitive isoforms of lymphoid enhancer factor-1 are selectively expressed in colon cancer. *Nat Genet* 28(1): 53–57.
41. Filali M, Cheng N, Abbott D, Leontiev V, Engelhardt JF (2002) Wnt-3A/beta-catenin signaling induces transcription from the LEF-1 promoter. *J Biol Chem* 277(36): 33398–33410.
42. Roose J, Clevers H (1999) TCF transcription factors: molecular switches in carcinogenesis. *Biochim Biophys Acta* 1424(2–3): M23–37.
43. Zhang QG, Wang R, Khan M, Mahesh V, Brann DW (2008) Role of Dickkopf-1, an antagonist of the Wnt/beta-catenin signaling pathway, in estrogen-induced neuroprotection and attenuation of tau phosphorylation. *J Neurosci* 28(34): 8430–8441.
44. Lucas JJ, Hernandez F, Gomez-Ramos P, Moran MA, Hen R, et al. (2001) Decreased nuclear beta-catenin, tau hyperphosphorylation and neurodegeneration in GSK-3beta conditional transgenic mice. *Embo J* 20(1–2): 27–39.
45. McCullough LD, Hurn PD (2003) Estrogen and ischemic neuroprotection: an integrated view. *Trends Endocrinol Metab* 14(5): 228–235.
46. Quintanilla RA, Munoz FJ, Metcalfe MJ, Hirschfeld M, Olivares G, et al. (2005) Trolox and 17beta-estradiol protect against amyloid beta-peptide neurotoxicity by a mechanism that involves modulation of the Wnt signaling pathway. *J Biol Chem* 280(12): 11615–11625.
47. Toran-Allerand CD, Singh M, Setalo G Jr (1999) Novel mechanisms of estrogen action in the brain: new players in an old story. *Front Neuroendocrinol* 20(2): 97–121.
48. Belcher SM, Zsarnovszky A (2001) Estrogenic actions in the brain: estrogen, phytoestrogens, and rapid intracellular signaling mechanisms. *J Pharmacol Exp Ther* 299(2): 408–414.
49. Miller DB, Ali SF, O'Callaghan JP, Laws SC (1998) The impact of gender and estrogen on striatal dopaminergic neurotoxicity. *Ann N Y Acad Sci* 844: 153–165.
50. Sawada H, Ibi M, Kihara T, Urushitani M, Honda K, et al. (2000) Mechanisms of antiapoptotic effects of estrogens in nigral dopaminergic neurons. *FASEB J* 14(9): 1202–1214.
51. Sawada H, Ibi M, Kihara T, Honda K, Nakamizo T, et al. (2002) Estradiol protects dopaminergic neurons in a MPP+Parkinson's disease model. *Neuropharmacology* 42(8): 1056–1064.
52. Kenchappa RS, Diwakar L, Annapu J, Ravindranath V (2004) Estrogen and neuroprotection: higher constitutive expression of glutaredoxin in female mice offers protection against MPTP-mediated neurodegeneration. *FASEB J* 18(10): 1102–1104.
53. Morissette M, Jourdain S, Al Sweidi S, Menniti FS, Ramirez AD, et al. (2007) Role of estrogen receptors in neuroprotection by estradiol against MPTP toxicity. *Neuropharmacology* 52(7): 1509–1520.
54. Culmsee C, Vedder H, Ravati A, Junker V, Otto D, et al. (1999) Neuroprotection by estrogens in a mouse model of focal cerebral ischemia and in cultured neurons: evidence for a receptor-independent antioxidative mechanism. *J Cereb Blood Flow Metab* 19(11): 1263–1269.
55. Dubal DB, Shughrue PJ, Wilson ME, Merchenthaler I, Wise PM (1999) Estradiol modulates bcl-2 in cerebral ischemia: a potential role for estrogen receptors. *J Neurosci* 19(15): 6385–6393.
56. Wise PM, Dubal DB (2000) Estradiol protects against ischemic brain injury in middle-aged rats. *Biol Reprod* 63(4): 982–985.
57. Wise PM, Dubal DB, Wilson ME, Rau SW, Bottner M (2001) Minireview: neuroprotective effects of estrogen—new insights into mechanisms of action. *Endocrinology* 142(3): 969–973.
58. Simpkins JW, Yang SH, Liu R, Perez E, Cai ZY, et al. (2004) Estrogen-like compounds for ischemic neuroprotection. *Stroke* 35(11 Suppl 1): 2648–2651.
59. Garcia C, Calvo E, Nieto A (2007) The transcription factor SOX17 is involved in the transcriptional control of the uteroglobin gene in rabbit endometrium. *J Cell Biochem* 102(3): 665–679.

